UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1946-1947. *(Série U, n° 119)*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HAPTOGLOBINE

THÈSE

présentée et soutenue le 1947

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université

PAR

Pierre GILLARD

EXAMINATEURS DE LA THÈSE { MM. P. FLEURY, Professeur, *Président.* GUILLOT, Professeur. RAOUL, Professeur. } *Juges.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE M. DECLUME

1947

FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Nom du Candidat : **GILLARD**

Prénom : **Pierre**

Date de la soutenance : .....

Numéro d'ordre : 119

GILLARD (Pierre).

Contribution à l'étude de l'Haptoglobine. Lons-le-Saunier, impr. M. Declume, 1947, In-8°, 158 pages, 23 tableaux, 22 figures.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U., n° 119.

GILLARD (Pierre).

Contribution à l'étude de l'Haptoglobine. Lons-le-Saunier, impr. M. Declume, 1947, In-8°, 158 pages, 23 tableaux, 22 figures.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U., n° 119.

GILLARD (Pierre).

Contribution à l'étude de l'Haptoglobine. Lons-le-Saunier, impr. M. Declume, 1947, In-8°, 158 pages, 23 tableaux, 22 figures.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U., n° 119.

GILLARD (Pierre).

Contribution à l'étude de l'Haptoglobine. Lons-le-Saunier, impr. M. Declume, 1947, In-8°, 158 pages, 23 tableaux, 22 figures.

Th. Pharm. Doct. Univ. Paris, 1947, Série U., n° 119.

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1946-1947. *(Série U, n° 119)*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'HAPTOGLOBINE

THÈSE

présentée et soutenue le 1947

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université

PAR

Pierre GILLARD

EXAMINATEURS DE LA THÈSE { MM. P. FLEURY, Professeur, *Président.* GUILLOT, Professeur. RAOUL, Professeur. } *Juges.*

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE M. DECLUME

1947

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. René FABRE..... Doyen, ✻, ◍ I.
SOMMELET..... Assesseur, ✻, ◍ I.
H.-J. LIONNET.... Secrétaire, ◍ I.

PROFESSEURS

MM. SOMMELET, ✻, ◍ I.....	Chimie organique.
FABRE, ✻, ◍ I.....	Toxicologie.
DELABY, ✻, ◍ I.....	Pharmacie chimique.
PICON, ✻, ◍ I.....	Chimie minérale.
MASCRÉ, ✻, ◍ I.....	Botanique générale.
PARIS.....	Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
FLEURY, ◍ I.....	Chimie biologique.
SARTORY (A.) C. ✻, ◍ I.	Microbiologie.
JANOT, ◍ I.....	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ◍ I.....	Chimie analytique.
VALETTE, ◍ I.....	Zoologie appliquée.
BEDEL, ✻, ◍ I.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
GUILLOT.....	Physique.
RAOUL.....	Professeur sans Chaire.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. ✻, ◍ I. — GUÉRIN, O. ✻, ◍ I.
Professeurs honoraires : MM. DELÉPINE, O. ✻, ◍ I., et LEBEAU, O. ✻, ◍ I, Membres de l'Institut.
PERROT, C. ✻, ◍ I., COUTIÈRE, O. ✻, ◍ I.
BOUGAULT, O. ✻, ◍ I., LUTZ, ✻, ◍ I.
GORIS, O. ✻, ◍ I, HÉRISSEY, O. ✻, ◍ I.
LAUNOY, O. ✻, ◍ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. GAUTIER, ◍ I.	Sciences physiques.
DAVID.....	Sciences naturelles.
DOMANGE, ◍ I.	Sciences physiques et chimiques.
CRÉTÉ.....	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. HARISPE, trav. pratiques de 1re année.	Chimie générale et pharmaceutique.
MORETTE, trav. prat. de 2e et 3e années.	Chimie analytique.
N...	Micrographie.
CORRIEZ, ◍ I.	Physique.
Mlle LAMBIN ◍ I.	Microbiologie.
M. COURTOIS.....	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ◍ I.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ◍ A.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550021_0029

A MES PARENTS

Je dédie ce travail, modeste témoignage d'une reconnaissance et d'une affection infinies.

A MON ÉPOUSE

Elle trouvera ici l'assurance de ma grande affection.

A MES FILS

Puissent-ils par leur travail arriver un jour au but que nous leur proposerons.

A MA SŒUR, A MON FRÈRE

En souvenir de nos belles années de jeunesse vécues dans une ambiance familiale sans nuages.

A MES BELLES-SŒURS, A MON BEAU-FRÈRE

En gage d'une amitié qu'ils savent très grande.

A MON NEVEU

Sa réussite dans l'avenir sera pour moi la plus belle récompense de l'intérêt très affectueux que je lui porte.

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur FLEURY

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLOT

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RAOUL

Pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de faire partie de notre Jury de Thèse.

A Monsieur le Professeur M.-F. JAYLE

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Qui a inspiré, orienté ce travail et consacré de longues heures à sa discussion et à sa mise au point.

Aucun mot ne saurait traduire toute la reconnaissance, toute l'admiration, tout l'enthousiasme que nous éprouvons à son égard.

Nous le prions de trouver ici l'expression de nos remerciements les plus vifs et celle d'une immense et affectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur POLONOVSKI

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Qui nous a accueilli avec bienveillance.

Témoignage de notre profond respect et de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur BIDERMANN

MÉDECIN-CHEF DE LA S. N. C. F., RÉGION « EST »

Qui nous a permis dans une grande mesure de réaliser ce travail.

Notre profonde reconnaissance lui est acquise, ainsi que notre respectueuse gratitude.

A Monsieur le Docteur MÉRY

MÉDECIN-DIRECTEUR DU SANATORIUM DE SÉRICOURT.

Pour qui notre reconnaissance se double d'une vive et respectueuse amitié.

Qu'il veuille bien agréer ici tous les remerciements que nous lui devons pour les conseils précieux et les encouragements qu'il n'a cessé de nous prodiguer, avec une bienveillance qui lui assure notre fidèle attachement.

A Monsieur le Docteur ALIBERT

MÉDECIN-PRINCIPAL DE LA S. N. C. F., RÉGION « EST »

Dont la collaboration indispensable nous a été d'un grand secours. Nous l'en remercions très sincèrement et nous l'assurons de notre respectueuse amitié.

A Monsieur le Docteur LEROLLE

MÉDECIN-ASSISTANT DU SANATORIUM DE SÉRICOURT

Qui nous a, chaque fois qu'il le fallait, prêté son précieux concours. Avec nos plus vifs remerciements et nos sentiments très cordiaux.

INTRODUCTION.

La découverte en 1938 par M. Polonovski et M.-F. Jayle de la propriété du sérum sanguin d'activer la réaction peroxydasique de l'Hémoglobine, a été rapportée à une protéine sérique à laquelle ces auteurs donnèrent le nom d'« HAPTOGLOBINE ». Cette dénomination rappelle par son étiologie (ἅπτω = je me fixe sur), la conjugaison qui se produit entre cette protéine et l'hémoglobine et qui représente la base théorique des méthodes de dosage établies par les travaux de M.-F. Jayle, ainsi que celle de sa théorie sur la constitution des enzymes d'oxydation. L'Haptoglobine a été isolée du sérum par M.-F. Jayle et Abdellatif, qui ont donné la preuve de sa constitution glycoprotéidique, sans toutefois réussir à l'obtenir à l'état homogène.

Le but de ce travail a été d'étudier les caractères de la précipitation de l'haptoglobine par les sels neutres en fonction de la nature et du mode d'introduction de ces derniers dans les sérums sanguins. On connaît la forme logarithmique du tracé de la précipitation saline d'une protéine homogène et on sait que la pente de la droite est une caractéristique physicochimique de la protéine, qui est exploitée comme test de pureté. Mais on ignorait l'influence exercée par un mélange de protéines sur la précipitation de l'une d'entre elles, ne possédant pas de méthode pratique qui permît de doser rapidement, spécifiquement et quantitativement une protéine définie dans un mélange complexe. Le dosage de l'haptoglobine dans le sérum sanguin nous offrait cette possibilité, car le sérum est la somme d'une quantité considérable de

protéines encore imparfaitement dénombrées et le dosage de l'haptoglobine permet de trier avec beaucoup de précision une protéine très particulière dans cette collectivité hétérogène.

Dans un premier temps, nous avons modifié la technique d'activation de M.-F. Jayle, de façon à l'adapter à notre travail, en la sensibilisant au maximum et en remédiant aux erreurs qu'aurait pu apporter à la détermination de l'indice d'haptoglobine, la concentration saline croissante des filtrats de nos fractionnements. Nous nous sommes donc livré à l'étude de l'influence des différents facteurs, en particulier de la concentration des substrats sur la cinétique de la réaction peroxydasique.

Cette mise au point technique nous a amené à mesurer l'affinité du complexe enzymatique en lui appliquant la loi de Michaelis.

Nous avons alors utilisé cette technique pour l'étude du fractionnement de l'haptoglobine par SO_4 $(NH_4)_2$, SO_4 Mg, SO_4 Na_2, ClNa, par les mélanges de phosphates mono et bipotassiques à 3 pH différents et par l'acétate de potassium.

Nous avons étudié ensuite l'influence du pH, de la dilution et l'effet de dénaturation par les différents sels.

Puis nous avons cherché à prouver que l'haptoglobine était une protéine homogène en établissant sa courbe de précipitation en fonction du mode brutal ou très progressif de l'introduction du mélange salin.

Nous avons comparé en outre, les courbes de précipitation du complexe « Hémoglobine-Haptoglobine » avec celles de l'haptoglobine et de l'hémoglobine, afin d'objectiver la formation d'une combinaison d'addition et de discuter la nature de la réaction stœchiométrique entre les deux substances.

Dans une partie de nos recherches, nous avons travaillé en équipe avec M^lle^ O. Judas que nous remercions ici bien vivement, de façon à tracer comparativement les courbes de précipitation de l'haptoglobine, de l'azote et

du sucre protéidique ; cela nous a permis d'établir les corrélations physiopathologiques de l'haptoglobine avec les autres glycoprotéides du type α-β, et de mieux comprendre le rôle joué par ces globulines.

Enfin nous avons effectué un très grand nombre de dosages d'haptoglobine au Sanatorium de Séricourt (S.N.C.F.) et au Service Médical de la région « Est » et nous avons poursuivi son étude clinique au cours de la tuberculose pulmonaire avec MM. Bidermann, Mery, Lerolle et Alibert. Nous avons également précisé les relations entre l'haptoglobine et la vitesse de sédimentation globulaire, confirmant sur ce point les résultats obtenus par MM. E. Brissaud et M.-F. Jayle.

Avant d'exposer nos résultats, nous présenterons l'état actuel des travaux biochimiques effectués sur l'haptoglobine, dans le cadre d'une revue plus générale sur les glycoprotéides sériques.

CHAPITRE I.

ÉTAT ACTUEL DE LA BIOCHIMIE DE L'HAPTOGLOBINE.

L'étude biochimique systématique de l'Haptoglobine autour de laquelle gravite notre travail, nous introduit dans le domaine des réactions peroxydasiques que nous devons en premier lieu rapidement explorer à la lumière des conceptions enzymologiques actuelles. Nous procéderons du plus simple au plus complexe et, en partant du catalyseur minéral, nous étudierons successivement les propriétés de l'hématine, de l'hémoglobine, pour aboutir finalement au complexe Haptoglobine-Hémoglobine que nous mettrons en parallèle avec la peroxydase végétale.

1° Catalyse minérale des réactions d'oxydation par les peroxydes.

La catalyse minérale du système peroxyde (P) — Substrat (DH_2) a donné lieu à de nombreux travaux qui nous permettent d'interpréter ainsi son mécanisme : le premier temps consiste en une combinaison du catalyseur et du substrat et réside en une déformation de la molécule du peroxyde qui acquiert des propriétés d'oxydation nouvelles. On peut à ce sujet citer plusieurs types de modèles, dont le plus simple est l'aldéhyde formique (Woker) qui, en formant une combinaison d'addition

avec l'eau oxygénée, donne une coloration bleue en présence de benzidine. Le dérivé formé n'est autre que l'hydroperoxyde d'oxyméthyle instable qui se transforme rapidement en peroxyde de dioxyméthyle (Wieland et Wingler [1], forme stabilisée qui est incapable de donner des réactions « peroxydantes » avec les réactifs mentionnés. De même l'hydroperoxyde d'oxyméthyle, isolé à l'état d'ester par Rieche, oxyde directement la benzidine. Ce premier niveau d'oxydation du peroxyde est également obtenu avec de nombreux sels complexes du fer, où le métal est tellement masqué et solidement attaché, que les échanges de valences ne sont pas possibles ; c'est le cas du bromure de fer αα'-dipyridyl (F. Blau), du ferropentacyanure de sodium (Hoffmann), des combinaisons complexes des sels ferreux avec les acides barbituriques, des sels ferreux avec l'isonitrosomédon (Haas), etc..... Dans ces différentes réactions catalytiques, seuls la benzidine, la teinture de gaïac et le réactif de Meyer sont oxydés, mais l'acide iodhydrique, le leucovert de Malachite, le pyrogallol, le gaïacol, ne le sont pas. La transformation de ces derniers substrats implique un niveau d'oxydation plus élevé et n'est obtenu qu'en présence d'un catalyseur métallique à échange de valences variables. Le fer divalent permet par ses valences coordinatives le rapprochement entre le substrat et le peroxyde, nécessaire à l'action catalytique, et assure en outre le transfert électronique entre le peroxyde et le donneur d'hydrogène.

On peut envisager ici deux types principaux de catalyse :

a) Un premier type qui implique une affinité double pour le substrat et le peroxyde. Szent-Györgyi [2] insiste à ce sujet sur l'importance de la structure du substrat dont les deux oxydriles en ortho forment avec le fer ou le cuivre un noyau pentagonal sur lequel vient se fixer le peroxyde. La catalyse prend fin par dissolution du complexe et libération du substrat oxydé et du

fer trivalent. Pour cet auteur il y a déshydrogénation du susbtrat et transport des électrons sur le peroxyde.

b) Un second type, en désaccord avec le premier, où le substrat, l'acide iodhydrique par exemple, ne présente pas d'affinité pour le catalyseur. Il s'agit alors de l'augmentation de la vitesse d'une réaction d'oxydation qui, spontanément, évolue très lentement.

Certains réactifs révèlent l'existence du composé instable et fugace fer-peroxyde. Le réactif de Trillat (tétraméthyldiaminodiphénylméthane) fournit une coloration bleue transitoire. L'acide tartrique, au cours de son oxydation, donne une coloration jaune-verdâtre. Conformément à l'hypothèse ancienne de Manchot [3], Bach et Engler [4], reprise par Job [5] et plus récemment par M.-F. Jayle [6], ces données peuvent être interprétées de la façon suivante : le peroxyde porte le fer à un état supérieur d'oxydation en arrachant des électrons à sa couronne périphérique. Ce dérivé instable oxyde un certain nombre de molécules pendant la période très courte de son existence et se transforme finalement irréversiblement en fer ferrique, qui est incapable de poursuivre la catalyse. On ne peut, à vrai dire, parler ici de catalyse et ce phénomène entre plutôt dans le cadre des réactions « peroxydantes » de Wolff et Stoeklin [7]. Pour qu'il y ait catalyse, il est nécessaire de faire intervenir une substance réductrice qui, sans être oxydée par le peroxyde, s'oppose à tout instant à la formation de fer trivalent. C'est ce qui se passe au cours de l'oxydation de l'acide tartrique ou du fructose : l'acide dioxymaleique et le fructosone remplissent ces conditions.

En résumé, la catalyse de l'oxydation d'un substrat par un sel ferreux, implique deux stades successifs d'activation du peroxyde : le premier rend compte de la combinaison catalyseur-peroxyde par des valences coordinatives ; le second nécessite la mise en jeu des valences principales du métal et conduit à un dérivé d'oxydation supérieur du fer ; enfin l'ion ferreux ne devient un

catalyseur que par adjonction au système d'un complément indispensable, en l'espèce une substance réductrice R qui protège le catalyseur contre l'effet destructeur du peroxyde. On peut décomposer la réaction comme suit, en représentant par DH_2 le substrat hydrogené et par P le peroxyde :

$$R\ Fe^{++} + P \longrightarrow$$
$$R\ Fe^{++}\ P \longrightarrow$$
$$R\ Fe^{++++}\ P + DH_2 \longrightarrow$$
$$R\ Fe^{++} + D + PH_2$$

En l'absence de la substance réductrice R, le fer divalent se transforme presque immédiatement et irréversiblement en son dérivé trivalent qui ne possède aucune propriété catalytique sur l'activation du peroxyde.

On peut en conclure avec M.-F. Jayle que la catalyse minérale comprend, d'une part, un ion métallique pouvant se transformer par le jeu de ses valences principales en un dérivé instable et supérieur d'oxydation et d'autre part une substance complémentaire dont le rôle est de protéger le métal contre l'effet destructeur du peroxyde et d'assurer l'équilibre réversible entre le fer divalent et la forme instable d'oxydation supérieure.

2° Activité catalytique de l'hématine et de ses dérivés.

Si l'on enchâsse maintenant le fer dans un noyau porphyrinique, nous voyons apparaître une nouvelle propriété fondamentale du fer trivalent. Celle-ci consiste en la formation d'une combinaison d'addition stable hématine-peroxyde étudiée spectrographiquement par Haurowitz [8]. Cette affinité existe également pour l'hème. Ce composé se forme dans les zones de pH où il ne présente aucun effet catalytique, ce qui permet de dissocier le stade d'induction de la catalyse, de sa période efficiente où elle est conditionnée par l'instabilité de ce dérivé. L'hémine-phosphate présente trois activités cataly-

tiques nettement différentes. Suivant les conditions expérimentales et les substrats, elle peut fonctionner comme oxydase, peroxydase ou catalase. L'hématine n'acquiert toute sa valeur catalytique qu'en présence de certaines bases azotées qui augmentent et orientent son activité dans un sens déterminé. Ainsi, la nicotine exalte ses propriétés oxydasiques ; l'imminazol accroît à la fois ses propriétés oxydasiques et peroxydasiques, mais l'acide 4-5 phényliminazolparasulfonique n'accélère très fortement que la réaction peroxydasique. Il en est de même de la globine, qui, sans exalter ni diminuer les propriétés oxydasiques et catalasiques de l'hème ou de l'hématine, augmente considérablement leur activité peroxydasique.

3° Activité enzymatique comparée de l'hémoglobine et des peroxydases végétales.

A. — Spécificité et affinité.

Depuis Schönbein (1860) [9], nous savons que l'hémoglobine a la propriété d'activer l'eau oxygénée en faveur de l'oxydation de certains substrats hydrogénés comme la teinture de gaïac, l'eau gaïacolée, etc... Cette réaction peut être représentée par le schéma général suivant :

$$ROOH + DH_2 = ROH + D + H_2O$$

R peut être de l'hydrogène et il s'agit alors de peroxyde d'hydrogène H_2O_2, ou encore un radical alcoyle tel que CH_3, C_2H_5, C_3H_7, et l'on a affaire à un hydroperoxyde d'alcoyle.

D'autre part DH_2 peut être représenté par de l'acide iodhydrique, ce qui donne l'équation :

$$ROOH + 2\ IH = ROH + I_2 + H_2O$$

particulièrement favorable à l'étude systématique de l'activité d'un système peroxydasique, l'iode dégagé étant facilement dosé en fonction du temps par une solution titrée d'hyposulfite de sodium.

L'examen détaillé du schéma général des réactions peroxydasiques, montre combien l'homogénéité de structure des différents peroxydes connus, s'oppose à l'hétérogénéité des substrats réducteurs. En effet, tous les peroxydes organiques s'apparentent à l'eau oxygénée et seule la substitution d'un ou de deux hydrogènes par un ou deux radicaux organiques en différencie la formule. Leur représentation se fera donc à l'image du peroxyde d'hydrogène, à savoir :

$$OH - HO \rightleftharpoons \begin{matrix} H \\ H \end{matrix} > \overset{+}{O} \longrightarrow \overset{-}{O}$$

L'existence de ces deux formes tautomères en équilibre, l'une étant symétrique, l'autre étant un dipôle qui met en valeur la surcharge en oxygène, est parfaitement en accord avec les propriétés chimiques et physiques de l'eau oxygénée.

Wieland et Sutter [10] ont recherché l'activation par les peroxydases de toute une série de peroxydes organiques. Ils concluent que les peroxydes disubstitués, comme les peroxydes de diéthyle, de disuccinyle, de dihydroxyméthyle, n'étaient pas activés, alors que tous les monosubstitués l'étaient. C'est donc le groupement $H > O \longrightarrow O$ qui est visé par la spécificité de ces enzymes. La mise en parallèle de l'activité catalytique des peroxydases végétales et de l'hémoglobine, en fonction du peroxyde utilisé, fait apparaître une distinction tout à fait remarquable entre ces deux enzymes. Alors que le peroxyde d'hydrogène est très fortement activé par les peroxydases végétales (l'enzyme du raifort par exemple), l'introduction dans sa formule d'un groupement alcoyle modère considérablement la vitesse de la réaction. Et c'est l'inverse que l'on observe avec l'hémoglobine. L'activité de celle-ci a été mesurée par Willstätter (Purpurogallinzahl), qui l'a trouvée plus de 10.000 fois inférieure à celle d'une préparation de peroxydase du raifort vis-à-vis de l'eau oxygénée. Nous ne nous étonnons donc pas de l'avoir vue rayée pendant longtemps du groupe des catalyseurs d'oxydation biologique.

Mais son comportement est totalement différent, si nous substituons à l'eau oxygénée un hydroperoxyde d'alcoyle, pour lequel nous lui voyons affecter alors une spécificité surprenante (avec C_2H_5OOH et CH_3OOH en particulier). M.-F. Jayle a trouvé que dans ces conditoins, le rapport des activités tombe de plus de 10.000 à moins de 100. Il en conclut qu'il faut différencier deux groupes de peroxydases :

1° Les hydroperoxydases, dont le type est la peroxydase végétale ou celle du lait.

2° Les hydroalcoyloperoxydases, auxquelles appartient l'hémoglobine.

Il opposa le système (b), spécifique de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine, au système (a), établi pour l'enzyme végétal par Szent-Györgyi :

(*a*) H_2O_2 -peroxydase-flavones-acide ascorbique
(*b*) ROOH -Hémoglobine-acide ascorbique.

Dans le système (b) l'acide ascorbique n'intervient pas seulement comme substrat : il tamponne l'action de l'hémoglobine, la modère au début, la régularise par la suite, en déplace le pH vers l'acidité et l'active tout en la prolongeant. Il rend la catalyse proportionnelle à la concentration du catalyseur, il est un véritable activateur complémentaire de l'action catalytique incomplète du système binaire « globine-hématine » et représente un troisième élément du complexe enzymatique.

Nous voyons ainsi que la spécificité des peroxydases végétales d'une part, de l'hémoglobine d'autre part, à l'égard du peroxyde, est sans équivoque et c'est là un premier caractère distinctif essentiel.

B. — Influence du pH.

Le pH optimum de l'activité des peroxydases végétales est situé, avec le système d'oxydation à l'iodure, aux environs de 3. Il est par contre fort difficile de préciser le pH optimum de l'activité peroxydasique de l'hémo-

globine. Non seulement il varie avec le substrat utilisé, cystéine, glutathion, acide ascorbique, polyphénol ou acide iodhydrique, mais encore il dépend de la concentration du peroxyde, de la température et de la nature du sel tampon. Si l'on s'adresse à l'acide iodhydrique comme substrat et à l'acétate ou au citrate comme tampon, ce pH se situe à 5,6 pour une normalité en peroxyde de N/150 et à 4,9 pour une normalité N/500. A cette dernière concentration, en opérant avec une méthode à forte dilution, la cinétique de la réaction est complètement différente en deçà ou au delà du pH optimum. Dans la zone alcaline de la courbe d'activité pH, on observe une phase d'induction de 1 à 3 minutes, au cours de laquelle se produit la collusion entre le peroxyde et le catalyseur et où l'activité augmente graduellement. Elle passe par un maximum après quelques intants et suit alors une courbe de décroissance exponentielle du type

$$y = e^{-kx}$$

où k représente la constante de destruction de l'hémoglobine par l'oxydant [11]. Dans la zone acide, entre les pH 4 et 5, le temps d'induction est considérablement raccourci et ne dure que quelques secondes : il est impossible de préciser alors la constante de destruction, tellement cette dernière est brutale et rapide. Cette destruction du pigment sanguin est d'autant plus forte que la température est plus élevée, ce qui explique que l'augmentation de la température entraîne une déviation apparente du pH optimum vers l'alcalinité.

Si l'on change de substrat et si l'on remplace l'acide iodhydrique par l'acide ascorbique, on voit le pH optimum s'abaisser, alors qu'il devient voisin de la neutralité si on s'adresse au glutathion ou à la cystéine.

Enfin, la nature du tampon influence encore la réaction et, dans les mêmes conditions expérimentales, le pH passe de 4,9 avec l'acétate et le citrate, à 4,3 avec le phosphate [12].

Il apparaît en somme que l'activité catalytique de l'hé-

moglobine est conditionnée par deux facteurs qui agissent en sens inverse. Quand le pH s'abaisse au-dessous de 5, nous voyons augmenter l'instabilité du dérivé hémoglobine-peroxyde et par suite l'intensité de la catalyse, mais nous voyons aussi s'accroître dans le même sens sa vulnérabilité, c'est-à-dire la destruction du catalyseur. Si l'on pouvait déterminer la quantité d'iode dégagé après 15 secondes, on obtiendrait, au pH optimum, une constante de vitesse de la réaction très différente de celle que l'on constate en laissant le système évoluer quelques minutes. Cette fragilité du catalyseur est également une des différences essentielles qui séparent l'hémoglobine d'une peroxydase vraie d'origine végétale.

Le pH optimum est donc pour l'hémoglobine une notion encore plus relative que pour tout autre enzyme. Tous les facteurs agissent sur sa détermination et, pour une certaine molarité des substrats et une même température, il dépend avant tout de la durée de la catalyse.

M.-F. Jayle dégage de cette étude [13] la conclusion que l'hémoglobine n'est pas utilisable comme catalyseur au pH où la vitesse initiale de la réaction est la plus élevée, en raison de sa destruction rapide, et que, pour étudier les lois qui régissent la cinétique de la catalyse par l'hémoglobine, il faudra se placer, pour un volume total de 100 cm^3, à un pH de 5,6 où la réaction évolue au ralenti.

C. — Influence de la concentration en Iodure.

Kühn et Braun [14] avaient déjà montré que dans la réaction enzymatique la vitesse de la catalyse était peu influencée par la concentration en iodure de potassium. Ce fait a été confirmé par Saïd Ishak [15] qui a trouvé qu'en présence d'hémoglobine, pour une concentration de peroxyde N/500, la vitesse maxima de la réaction était atteinte pour une molarité en iodure égale à M/20 et qu'au delà de cette concentration la courbe marquait un plateau, au lieu d'avoir une forme en cloche, comme

c'est le cas pour les substrats qui ont une affinité mesurable à l'égard du catalyseur. Saïd en déduit que le peroxyde est le seul substrat qui se fixe sur l'hémoglobine, les molécules d'iodure de potassium ne formant pas de combinaison avec ce catalyseur.

D. — Influence de la concentration en peroxyde.

Willstätter et Stoll [16], en établissant la courbe d'activité d'une peroxydase en fonction de la concentration de l'eau oxygénée, avaient observé qu'elle répondait à la forme typique des courbes d'affinité de Michaëlis et qu'au delà d'une certaine concentration du peroxyde d'hydrogène, l'activité de la peroxydase devenait décroissante. Ils restituèrent à l'enzyme son activité initiale, en détruisant l'excès d'eau oxygénée par addition de catalase.

Cette observation expérimentale fut confirmée plus récemment par G. Mann, qui en tira la mesure de l'affinité de quelques préparations de peroxydases végétales [17].

Ainsi que l'ont montré Willstätter et Pollinger [18] d'une part, M.-F. Jayle et Saïd d'autre part, le comportement de l'hémoglobine est tout à fait différent. En effet si, pour une teneur fixe en hémoglobine, on dose la quantité d'iode dégagé au bout de quatre, six et douze minutes, en fonction de normalités croissantes en peroxyde, à pH 5,6, on constate que les résultats obtenus s'inscrivent graphiquement conformément à la loi des isothermes d'adsorption de Freundlich :

$$a = \alpha . C^{\frac{1}{N}}$$

où α est une constante, N un nombre entier, a l'activité enzymatique exprimée en iode et C la concentration en peroxyde.

En effet si, comme dans la figure 1, on inscrit en abscisse le logarithme de la concentration en peroxyde et en ordonnée le logarithme de l'activité du système en-

zymatique, on obtient trois droites correspondant aux temps de réaction 4, 6 et 12 miniutes. Leur pente est égale à l'exposant 1/N.

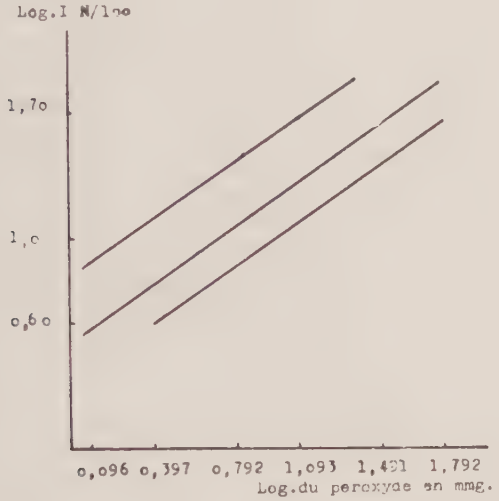

Fig. 1. — Log. de l'activité peroxydasique de l'hémoglobine en fonction du log. de la concentration en peroxyde pour des temps de réaction variés.

Ainsi, l'activité peroxydasique de l'hémoglobine augmente continuellement en fonction de la concentration du peroxyde, sans que l'on puisse définir une zone de saturation ni une zone d'inhibition. La loi de Michaëlis ne s'applique pas ici et il est impossible de calculer, à partir de ces données expérimentales, l'affinité du pigment sanguin. Le peroxyde se répartit entre la phase aqueuse et les particules d'hémoglobine, comme il le ferait si l'on avait affaire à un simple adsorbant.

E. — Influence de la concentration de l'enzyme.

Les conclusions de M.-F. Jayle et Saïd à cet égard sont là encore superposables aux résultats que Willstätter

et POLLINGER avaient obtenus avec l'hémoglobine en s'adressant à la réaction pyrogallol-H_2O_2. Comme l'indique la figure 2, qui porte en abscisse le logarithme de la concentration en hémoglobine et en ordonnée celui de l'action catalytique, la loi de la catalyse enzymatique fait défaut et c'est encore celle des isothermes d'adsorption de FREUNDLICH qui s'y substitue. Dans certaines limites en effet, la catalyse par une peroxydase végétale (peroxydase vraie), est rigoureusement proportionnelle à

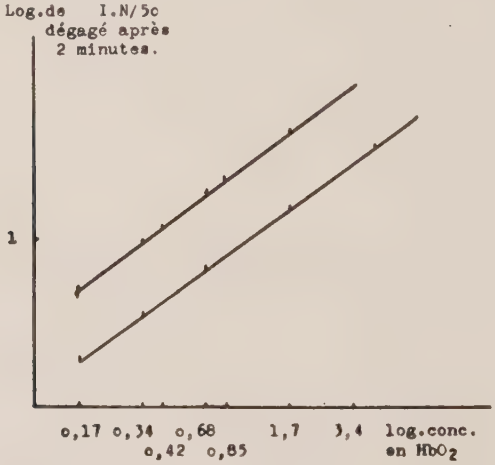

FIG. 2. — Log. de l'activité peroxydasique en fonction du log. de la concentration de l'hémoglobine pour des temps de réaction variés.

la concentration de l'enzyme et le graphique de l'activité est linéaire. Pour l'hémoglobine au contraire, on obtient une courbe logarithmique qui devient une droite quand on substitue à l'activité et à la concentration du catalyseur, les logarithmes de ces valeurs. L'équation de FREUNDLICH s'applique encore ici, la variable C devenant la concentration en hémoglobine. La pente de la droite permet le calcul du coefficient I/N.

F. — Cinétique de la réaction en fonction du temps.

L'enzyme végétal est parfaitement adapté à sa fonction peroxydasique et son activité est une fonction linéaire du temps, une droite passant par le point de rencontre des coordonnées. Il n'en est pas de même pour l'hémoglobine. A pH 5,6 en milieu fortement dilué, on distingue deux stades dans la réaction. Dans le premier temps, véritable phase d'induction au cours de laquelle se produit la combinaison entre le peroxyde et le catalyseur, la vitesse de réaction s'accroît et passe par un maximum ; dans le second, ou période d'état, elle diminue suivant une décroissance exponentielle et répond à l'équation :

$$y = e^{-kt}$$

où k représente la constante de destruction du pigment sanguin dans les conditions expérimentales choisies. La figure 3 empruntée au travail de Saïd Ishak, porte en

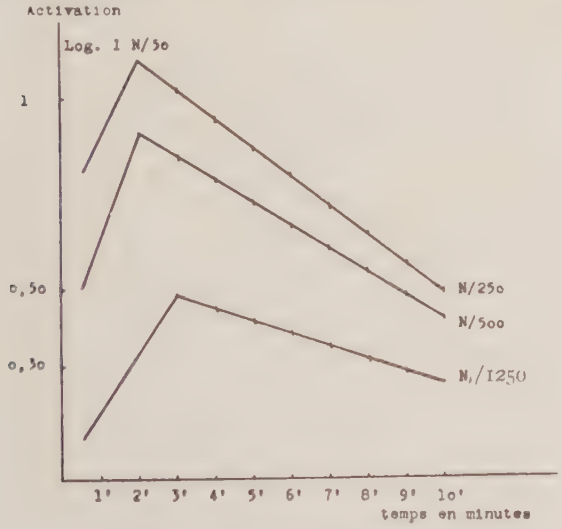

Figure 3.

ordonnée le logarithme de l'activité et en abscisse le temps, pour des concentrations en peroxyde qui sont respectivement N/250, N/500, et N/1.250. Elle démontre clairement que la vitesse croît, puis décroît exponentiellement, mais qu'au signe près de l'exposant, les deux periodes de la cinétique catalytique répondent à la même formule.

G. — Influence inhibitrice de l'iode.

L'iode libre n'a aucun effet sur la marche du système d'oxydation activé par une peroxydase végétale. Il en va autrement avec l'hémoglobine, qui est rapidement inhibée par ce métalloïde. Ceci nécessite la titration progressive, par l'hyposulfite de sodium, de l'iode dégagé, en évitant néanmoins d'introduire dans le milieu un excès de réducteur. Si donc on laisse évoluer le système :

ROOH — HG — IH

on constate qu'il libère une certaine quantité d'iode et qu'il atteint au bout de quelques minutes un équilibre rompu seulement par l'addition d'un réducteur. Si, avant d'ajouter le peroxyde, on introduit dans le milieu la quantité d'iode qui caractérise l'état d'équilibre, on bloque la catalyse, ce qui ne se produit pas, répétons-le, avec les peroxydases vraies. La quantité d'iode nécessaire à l'inhibition de la catalyse, est d'autant plus faible que l'on s'écarte davantage du pH optimum, vers des acidités croissantes. Ainsi, à une concentration en peroxyde voisine de N/150, l'inhibition, faible à pH 5,8, devient très marquée aux environs du pH 4,4, où la catalyse est suspendue par la présence d'infimes quantités de l'halogène, soit par exemple 0,5 cm^3 d'une solution d'iode N/100. Dans des conditions expérimentales déterminées, à pH 4,4, en présence de 0,2 cm^3 d'hémoglobine humaine M/20.000 en fer hématique, ajoutons simultanément, au temps zéro minute, 0,5 cm^3 d'iode N/100 et le peroxyde, et laissons évoluer le système pendant 5 minutes. On

constate que la quantité d'iode dégagé dans cet intervalle de temps correspond à celle qui aurait été libérée à la même température et au même pH par le couple témoin ROOH—IH. C'est donc la preuve que le pigment sanguin ne possède, dans ces conditions, aucune activité peroxydasique, par suite du blocage de la réaction.

Ainsi, bien que l'activité peroxydasique de l'hémoglobine soit appréciable si l'on choisit convenablement le peroxyde et le substrat réducteur, il n'en ressort pas moins que cette activité diffère profondément de celle d'une peroxydase vraie. L'hémoglobine nous apparaît comme une peroxydase incomplète, beaucoup plus fragile que la peroxydase végétale, moins adaptée à son rôle catalytique et dont la cinétique obéit à des lois qui ne sont pas celles que l'on rencontre habituellement en enzymologie.

4° Propriétés enzymatiques du complexe hémoglobine-haptoglobine.

En 1938, M.-F. Jayle, étudiant avec M. Polonovski les propriétés catalytiques de l'hémoglobine et recherchant l'activité peroxydasique de différents sérums pathologiques, eut l'idée d'introduire dans un de ses échantillons de sérum une petite quantité d'hémoglobine humaine. Simple initiative, que M.-F. Jayle classe modestement dans le domaine du hasard scientifique, mais qui devait l'amener à une découverte extrêmement importante, ouvrant un nouveau chapitre de biologie et jetant une lueur nouvelle sur la physiopathologie des protéines sériques. Il constata en effet que la quantité d'iode dégagé au bout de 5 minutes était relativement plus forte que la somme des activités séparées du pigment sanguin et du milieu plasmatique. Par simple mélange donc, d'hémoglobine et de sérum, une activation réciproque avait pris naissance, une véritable exaltation de la catalyse s'était opérée. Et ce phénomène devenait beaucoup plus manifeste, beaucoup plus intense, si, au lieu d'opérer à

pH 3, on portait celui-ci à 4,2. L'addition d'un sérum pathologique avait ainsi complètement modifié la marche de la catalyse hémoglobinique. Le pH optimum passait de 5,6 à 4,2, la réaction s'intensifiait considérablement l'inhibition par l'iode disparaissait.

L'activité du mélange hémoglobine-sérum pathologique à pH 4,4 est plus de 10 fois supérieure à celle de l'hémoglobine seule. Elle est encore le double de celle du pigment sanguin mesurée à son pH optimum, c'est-à-dire à pH 5,8, dans les conditions opératoires utilisées pour cette réaction.

Le sérum sanguin non hémolysé, qui, de lui-même, ne possède aucune activité peroxydasique, confère donc à l'hémoglobine des propriétés enzymatiques nouvelles. M. Polonovski et M.-F. Jayle attribuèrent la responsabilité de ce phénomène à une protéine sérique qu'ils situèrent tout d'abord entre les albumines et les globulines et qu'ils dénommèrent « Haptoglobine », représentée couramment par l'abréviation Hp.

M.-F. Jayle entreprit alors l'étude systématique de la cinétique de l'activité de ce nouveau complexe peroxydasique. Ayant remarqué que l'hémoglobine de cheval ou de bovidé était beaucoup plus active que celle de l'homme, il utilisa dans ses expériences 0,1 à 0,2 cm^3 d'une solution d'hémoglobine cristallisée de cheval M/20.000 en fer hématique.

A. — Influence du pH.

Nous avons déjà vu que le pH optimum du complexe hémoglobine-haptoglobine était dévié vers l'acidité de plus d'une unité par rapport à celui de l'hémoglobine seule. Dans les conditions expérimentales choisies par l'auteur, pour une concentration de peroxyde N/150, le pH optimum de l'hémoglobine est égal à 5,6-5,8 et celui du complexe hémoglobine-haptoglobine à 4,2. En milieu plus dilué, pour une concentration de peroxyde N/500, le

pH optimum du complexe passe de 4,2 à 3,4. Il se rapproche donc de celui des peroxydases végétales, qui, pour la réaction considérée, est situé précisément à ce niveau. Nous étudierons d'ailleurs dans le détail cette influence du pH au cours de nos recherches personnelles.

B. — Influence de la concentration du peroxyde.

Nous avons noté tout à l'heure, à propos de l'hémoglobine, qu'il était impossible de définir l'affinité de ce pigment à l'égard du peroxyde au cours de son action peroxydasique. Nous avons étudié dans notre travail, quel était le comportement du complexe hémoglobine-haptoglobine dans ces conditions, et nous exposerons plus loin nos résultats à ce sujet. Disons simplement ici que ce comportement est totalement différent de celui de l'hémoglobine seule.

C. — Cinétique de la réaction.

La cinétique de la réaction en fonction du temps est également profondément modifiée par l'addition du plasma, par suite de la résistance très accrue du catalyseur. La phase du début ne se distingue plus, au pH optimum du système, par une libération d'iode brusque et rapidement décroissante, mais au contraire par un démarrage très régulier, succédant à une phase d'induction très courte. A la période d'état, on assiste néanmoins à une décroissance exponentielle de la catalyse. Dans l'ensemble, la réaction se poursuit beaucoup plus longtemps et la cinétique est plus régulière. La mise en parallèle de la marche de ces deux réactions oppose la forme asymptotique du tracé hémoglobinique à l'allure approximativement linéaire de l'activité de Hb-Hp en fonction du temps. Le complexe a donc, comme la peroxydase vraie, une activité qui est une fonction linéaire du temps.

D. — Influence de l'iode.

L'iode qui, à une certaine concentration, bloquait l'action catalytique de l'hémoglobine, n'a plus aucun effet sur celle du complexe Hb-Hp. L'activité du système est alors identique, que l'on réduise l'iode au fur et à mesure de sa libération ou qu'on le titre au bout d'un temps déterminé. Cette constatation est éminemment précieuse, car elle donne le moyen d'étudier l'activité du catalyseur hémoglobine-plasma, même en présence d'un excès d'hémoglobine libre, qui peut être totalement exclue de la réaction par simple introduction d'iode. Nous en verrons l'application pratique au cours de notre exposé technique.

E. — Influence de la concentration de Hb-Hp.

Si, dans des conditions expérimentales déterminées, en présence d'une certaine quantité d'iode libre, on ajoute à 0,1 cm^3 de solution d'hémoglobine cristallisée de cheval M/20.000 en fer hématique, des doses décroissantes de plasma, allant par exemple de 0,2 cm^3 à 0 cm^3, on constate que l'activité du système peroxydasique exprimée en iode N/100, en fonction du plasma ajouté, s'inscrit graphiquement par un plateau sensiblement parallèle à l'axe des abscisses jusqu'à un point S ; si l'on continue à diminuer les quantités de plasma ajoutées, le plateau se continue alors par un tracé linéaire qui rejoint l'axe des abscisses au point O, correspondant à l'hémoglobine seule. La partie ascendante du tracé que l'on vient de parcourir en sens inverse, fait apparaître la proportionnalité rigoureuse entre l'activation catalytique de l'hémoglobine et la quantité de sérum ajoutée. Son aspect linéaire indique que l'hémoglobine et l'haptoglobine se combinent entre elles dans des proportions stœchiométriques et l'on pose par définition que le complexe hémoglobine-haptoglobine (Hb-Hp) résulte de la combinaison d'un atome de fer hématique avec une molécule

d'haptoglobine. Nous sommes donc loin, on le voit, de la loi des isothermes d'adsorption de Freundlich qui s'appliquait au pigment sanguin et à laquelle se substitue ici la loi fondamentale de la catalyse enzymatique. Quant au point d'intersection entre la portion ascendante et la portion horizontale, il précise la saturation, par le plasma choisi, de l'hémoglobine utilisée. Il caractérise le pouvoir « activant » du plasma, ou, en d'autres termes, la quantité de principe activateur qui s'y trouve.

La portion horizontale représente le plateau d'activation maxima. Elle correspond à la zone de saturation de la réaction.

On voit donc que l'on peut réaliser la saturation d'une quantité connue d'hémoglobine par le plasma, c'est-à-dire par la solution du principe activateur, l'haptoglobine. Il devient par conséquent possible de calculer la concentration molaire de cette dernière en recherchant la quantité de sérum ou de plasma nécessaire à la saturation d'une quantité donnée d'hémoglobine. L'haptoglobine se détermine ainsi par une véritable titrimétrie enzymatique, analogue à la titration d'une base par un acide.

Nous avons repris les expériences de M.-F. Jayle sous un angle un peu différent, mais on trouvera page 73 une figure (fig. 10) illustrant clairement ces dernières données.

5° Etude de la constitution de l'haptoglobine.

Après avoir présenté l'haptoglobine dans son cadre enzymologique, nous exposerons maintenant les divers aspects de son étude chimique et les différents résultats acquis.

A. — Constitution chimique de l'haptoglobine.

M.-J. Jayle avait déjà remarqué [19] que la fraction protéique du sérum riche en haptoglobine, avait une te-

neur particulièrement élévée en sucre. Il poursuivit cette étude avec Abdellatif et s'efforça de préciser cette richesse en glucides liés.

A cet effet, les auteurs mirent au point une technique de fractionnement que nous avons employée dans notre travail et que nous décrirons ultérieurement. Cette technique allie la rapidité de la méthode classique aux avantages de celle de diffusion à travers la membrane rotative de E. J. Cohn et Mac Meekin.

Ils partirent alors de sérums d'homme, de cheval et de chien et cherchèrent à situer la zone de précipitation de l'haptoglobine [20]. Nous menions simultanément, mais dans un but différent, un travail analogue et nos conclusions se superposèrent. Cette zone de précipitation, relativement constante pour une espèce animale donnée, se situe soit dans les albumines, soit dans les globulines, ainsi que nous le verrons dans l'exposé de nos recherches personnelles.

Ils entreprirent ensuite de nombreux dosages systématiques de sucre protéidique dans toutes les fractions isolées, en utilisant, d'une part, la méthode de Sörensen modifiée et adaptée à l'électrophotomètre de Meunier et d'autre part, la méthode de Hagedorn-Jensen appliquée au sucre lié par Dumazert et Penet. Les résultats obtenus furent remarquablement constants ; tous les dosages confirmèrent ces deux faits :

1°) Les globulines γ et la queue des albumines représentent les fractions les moins riches en glucides.

2°) La fraction protidique la plus riche en glucides liés coïncide toujours avec celle qui entraîne l'haptoglobine dans sa précipitation. La teneur moyenne de cette fraction en G.M.G. est de 10 %, dont 1/5° est clivé par acétolyse, ce qui révèle une liaison particulièrement labile.

Notons ici cet essai très intéressant effectué sur un sérum de nouveau-né dont l'indice d'haptoglobine est toujours égal à zéro. En comparant la richesse en sucre de

ses différentes fractions à celle des sérums précédemment étudiés, il apparut nettement que les fractions les plus riches en glucides se situaient exactement dans la zone où se trouve habituellement l'haptoglobine. On peut expliquer ce phénomène de deux façons : soit en admettant que l'haptoglobine est bloquée par des produits du métabolisme de l'hémoglobine, conformément à ce qui se passe pour les sérums hémolytiques, soit en acceptant l'hypothèse que ce protéide préexiste dans le plasma sous une forme inactive et est réactivé par le foie au fur et à mesure des besoins physiologiques.

Afin de se rendre compte si la fraction glucidique pouvait se dissocier partiellement de la fraction haptoglobinique, les auteurs firent varier la zone de précipitation de cette dernière, soit en modifiant le pH, soit en ajoutant au sérum une certaine quantité d'hémoglobine. Dans le premier cas, en faisant varier le pH de 7 à 4,7, ils constatèrent que, la zone de précipitation de l'haptoglobine ayant glissé vers les indices de saturation plus faibles en solution précipitante, le maximum de la courbe du sucre protéique se déplaçait dans le même sens. Dans le second cas, la zone de précipitation de l'haptoglobine, ainsi que nous l'expliquons plus loin, subit au contraire un décalage vers les fortes molarités salines et la courbe du sucre protéidique est entraînée parallèlement.

Cette double expérience constitue un argument précieux dans l'étude de la constitution chimique de l'haptoglobine, en montrant clairement que le glycoprotéide dont le taux en hydrates de carbone dépasse 10 %, suit fidèlement l'haptoglobine dans ses déplacements sur l'échelle des molarités salines.

M.-F. Jayle et Abdellatif complétèrent leur étude en effectuant l'absorption de la fraction haptoglobinique dans les filtres vert S53 et bleu S47. Ils constatèrent qu'elle était comparable à celle d'un mélange équimoléculaire de galactose-mannose.

Ayant d'autre part dosé le sucre protéidique de cette fraction à la fois par la méthode de Hagedorn et par la

méthode colorimétrique, ils obtinrent avec la première technique des résultats supérieurs de 50 % à ceux que donne la seconde technique. Or, comme la méthode colorimétrique ne décèle pas la glucosamine, qui est au contraire titrée dans le HAGEDORN, ils en conclurent que la discordance observée dans les résultats était parfaitement en accord avec la constitution de l'aminopolyholoside établie par les travaux de BIERRY, RIMINGTON et SÖRENSEN, selon lesquels ce polyholoside est un polymère d'un trisaccharide formé de mannose, de galactose et de N-acétylglucosamine.

B. — POSITION DE L'HAPTOGLOBINE PARMI LES GLYCOPROTÉIDES SÉRIQUES IDENTIFIÉS.

La nature glycoprotéidique de l'haptoglobine ayant été prouvée, plaçons la maintenant dans le cadre des glycoprotéides sériques actuellement connus. Nous débuterons à cet effet par une revue générale de cette importante question.

Etat actuel de la question.

Le problème du sucre protéidique a été posé en 1873 par HABERMANN, puis en 1875 par SCHÜTZENBERGER, qui, attaquant le blanc d'œuf par une solution de baryte, en retira ce qu'il appela une « amide cellulosique », d'où l'acide sulfurique libérait des substances réductrices. Plus tard, FRANKEL dénommait cette même substance « albumine » et mit en évidence la glucosamine dans les produits de son hydrolyse. Sa constitution fut définitivement établie par les travaux de LEVENE, qui en fit un polymère de trisaccharide dimannose-glucosamine. Parallèlement, de nombreux chimistes s'attaquaient aux protéines sériques et en retiraient, avec des succès divers, des substances réductrices. Ce fut MÖRNER qui ouvrit en 1893 la voie de ces recherches, en isolant de la sérumglobuline une substance analogue à la gomme.

Mais, malgré la confirmation apportée à ces travaux par de nombreux auteurs, Abderhalden en 1903 remit tout en question, en prouvant que l'albumine recristallisée ne donnait pas la réaction de Molisch et que celle-ci devait être dûe au sucre libre entraîné par la précipitation des protéines plasmatiques. Lepine [21] maintint néanmoins le point de vue de la réalité du sucre protéidique et le transposa magistralement sur le plan physiologique. Il considéra l'existence de deux formes de sucre protéidique : l'une fortement fixée à la molécule albuminique, l'autre beaucoup plus labile, libérable par l'acide fluorhydrique et surtout par les préparations brutes d'émulsine et d'invertine. Il émit toute une série d'hypothèses sur leur constitution. Il donna à la forme labile le nom de sucre virtuel : « sucre existant en puissance, ayant le pouvoir de servir immédiatement aux besoins de l'organisme ». Depuis, de nombreux auteurs : M. Arthus, A. Morel et Fraisse (1907), H. Bierry et L. Fandard (1912), J. Macleed et A. M. Weed (1913), Ege R. (1918-20), J. K. Best (1918) et enfin Deulofen (1929) en ont contesté l'existence. Mais le principe en a été repris récemment par Dumazert et Penet, comme nous le verrons plus loin.

Actuellement, les travaux récents de Bierry, Rimington, Sörensen, Hewitt, Mac Meekin, etc..., ont donné la preuve que la plupart des protéines contenaient des hydrates de carbone qui faisaient partie intégrante de leur molécule. Ils ont mis au point des méthodes de leur détermination quantitative et ont identifié un certain nombre de sucres dans leurs produits d'hydrolyse. Rimington y décela le mannose [22] et en fit un polymère du dimannose-glucosamine. Bierry [23] identifia le galactose et pensa qu'il s'agissait plutôt d'un aminopolyholoside constitué par la polymérisation d'un trisaccharide formé de galactose, de mannose et de N-acétyl-glucosamine. Sörensen et Haugaard [24], par leur ingénieuse technique photocolorimétrique, confirment la composition ternaire de la fraction glucidique et établissent la

proportion équimoléculaire des trois composants. A la lumière de ces faits expérimentaux, on peut se représenter la molécule d'un glycoprotéide comme constituée par une sorte de grappe composée de sphères polypeptidiques et polyholosidiques. Les unités polypeptidiques, d'un poids moléculaire de 17.500, sont unies entre elles et aux unités polyholosidiques par les forces d'attraction intermoléculaires de Van der Waals. Il est possible de provoquer la rupture de la micelle sans toucher aux liaisons glucosidiques, en faisant agir la potasse ou la baryte à 10 % en tube scellé ou à l'autoclave. Bierry [25] a réussi à isoler de cet hydrolysat, des fragments ayant un taux glucidique très élevé. Après avoir disloqué la molécule par action de la baryte à l'autoclave, le polyholoside est précipité par le sous-acétate de plomb, redissous dans l'acide acétique et purifié par plusieurs précipitations et redissolutions successives. Après avoir débarrassé la solution du plomb et de la baryte, on précipite les dernières impuretés par du sulfate mercurique. Le polyholoside est ensuite obtenu par action de l'alcool et de l'éther anhydre, sous forme d'une poudre amorphe blanche, fortement hygroscopique.

Il est également possible d'obtenir des peptones riches en hydrates de carbone, en faisant agir successivement sur les glycoprotéides, la pepsine et la trypsine et en précipitant l'aminopolyholoside par l'alcool ou l'acétone. Hewitt [26] et Rimington [27] ont ainsi réussi à obtenir des peptones dont la teneur en hydrates de carbone allait de 18 à 45 %.

La répartition des glycoprotéides du sérum est très complexe. D'après Rimington, la teneur de la globuline en sucre protéidique serait de 3,7 %. Lustig et Haas [28] ont déterminé par la méthode de Tillmans et Philippi [29], une teneur en hydrates de carbone allant, dans la fraction albuminique, de 0,47 à 0,65 % et dans différentes fractions globuliniques, de 0,64 à 8,5 %. Hewitt [30] trouve 3,3 % d'hydrates de carbone dans la fraction globulinique et 0,78 % dans la fraction albuminique.

Nillsson [31], en effectuant sur les fractions albuminiques et globuliniques des dosages de glucosamine par sa technique colorimétrique, observe des variations considérables du sucre albuminique au cours de la pneumonie. Normalement, la globuline contient 4 fois plus de glucosamine que l'albumine, soit entre 2,73 et 1,66 % pour la globuline, et entre 0,65 et 0,37 % pour l'albumine. Au cours de la pneumonie, les chiffres s'élèvent en moyenne à 3,33 pour la globuline et à 1,38 pour l'albumine. L'augmentation relative est donc plus forte pour les albumines que pour les globulines.

Hewitt [32-33-34] a identifié dans le sérum de cheval deux glycoprotéides auxquels il a donné les noms respectifs de « globoglycoïde » et de « séroglycoïde », qui indiquent suffisamment leur parenté avec les deux fractions protéiques.

Le sérum de cheval, dilué à 50 %, est additionné d'un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammoniaque et la fraction globulinique écartée par filtration. Le filtrat est amené à pH 4,7 par addition d'acide acétique et, après 24 heures, les cristaux d'albumine formés sont séparés. On les redissout dans une petite quantité d'eau et après avoir neutralisé le milieu, on ajoute un volume égal de la solution saline saturée. Le globoglycoïde se sépare sous forme d'abondants flocons blancs ; il contient 7,5 % de G.M.G. et est très riche en lipides. Sa teneur en tryptophane est de 0,80 %. Redissous, il donne une solution opalescente. Il coagule par la chaleur et précipite par l'acide trichloracétique à 2 %. La fraction sérique qui se sépare entre les indices de saturation 0,45 et 0,55 est très riche en ce glycoprotéide, qui possède une faculté particulière à entrer en combinaison avec d'autres protéides. Mélangé à la pseudoglobuline A humaine, il se transforme en euglobuline II. En présence de séroglycoïde, sa constante de précipitation saline est modifiée et il est entraîné avec les albumines. Récemment, Rimington [35] l'a obtenu sous une forme cristallisée, hexagonale, mais il observa qu'après plusieurs cris-

tallisations, les cristaux s'appauvrissaient en sucre et prenaient le type de la cristalbumine. Aussi, cet auteur conteste-t-il l'existence du globoglycoïde et pense-t-il qu'il s'agit d'une simple association entre la cristalbumine et le séromucoïde, rompue par cristallisation répétée. Mais le test des précipitines reste favorable au travail d'Hewitt et décèle 0,5 % de globoglycoïde dans le sérum de cheval.

Aux eaux-mères de cristallisation de l'albumine, Hewitt ajoute le quart du volume de la solution saline saturée et 1 cm^3 p. 1.000 d'acide acétique cristallisable. Il sépare alors une fraction qui, redissoute et reprécipitée aux 2/3 de saturation, lui fournit une albumine dont la teneur en hydrates de carbone peut atteindre 9,5 p. 100. Il la dénomme « séroglycoïde » et la retrouve également dans les eaux-mères de la deuxième cristallisation de l'albumine. Libérée du séroglycoïde, la cristalbumine cristallise sous forme d'aiguilles allongées, libres de toute trace d'hydrates de carbone, ce qui constitue un test de sa pureté.

Le séroglycoïde n'en diffère pas seulement par sa richesse en glucides, mais également par sa teneur en acides aminés. Le tryptophane a, dans la cristalbumine, un taux de 0,26 à 0,30 p. 100 et de 1 p. 100 dans le séroglycoïde. La cysteïne passe de 5,8 à 1,8 p. 100. Le pouvoir rotatoire du séroglycoïde est plus faible que celui de la cristalbumine. Enfin, il ne précipite pas par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 et ne coagule que très difficilement par la chaleur.

Beaucoup d'autres auteurs ont polarisé leurs travaux sur cette question des glycoprotéides sériques : Mac Meekin [36], Blix, Tiselius et Svensson [37], etc....., et il est à l'heure actuelle bien démontré qu'à l'exception de la cristalbumine, tous les protéides sériques contiennent de l'aminopolyholoside. Son rôle biologique n'est pas encore parfaitement élucidé. Sans doute celui-ci est-il fort complexe et participe-t-il à plusieurs fonctions physiologiques des protéines sériques, aux fonctions de transport

en particulier. Le cénapse lipido-protéidique de Machebœuf ou le simplexe de Sörensen, doivent être considérés comme une liaison qui s'établit entre les graisses et la molécule protidique, par l'intermédiaire d'un polyholoside.

L'immunochimie moderne a fait du polyholoside, le personnage déterminant de la spécificité antigénique, la particule protéique ne jouant que le rôle d'activateur. La cristalbumine dépourvue d'hydrates de carbone possède une activité antigénique tellement insignifiante (Rimington-Hewitt) qu'elle a même été contestée par de nombreux auteurs, alors que le globoglycoïde et le séroglycoïde provoquent facilement la formation de précipitines chez le lapin. Si la copule glucidique est porteur de la spécificité antigénique de l'espèce, elle intervient certainement aussi dans la formation des anticorps, sans qu'on puisse en donner la preuve concrète.

Le sucre protéidique représente-t-il une étape intermédiaire du métabolisme glucidique et doit-il être considéré comme un réservoir d'énergie glucidique ? C'est là un des grands problèmes physiologiques soulevés par l'hypothèse magistrale de Lepine.

Les travaux de Bierry [23] ont bien établi que le foie était au centre du métabolisme des glycoprotéides sanguins. Cet organe, même privé de glycogène par un jeûne prolongé ou des injections de phlorizoside, reste à même de produire du glucose directement à partir des protéines sériques. Les polyholosides circulants interviennent dans cette fonction hépatique, au même titre que les acides aminés glycoformateurs. Inversement, le foie, au cours de la décharge glycémique, est capable de renverser l'équilibre dans l'autre sens en augmentant la teneur du sang en sucre protéidique.

Roger, Rathery et Binet [38] ont montré que le poumon était également capable de provoquer la protéidoglycolyse.

L'hyperglycémie provoquée entraîne dans l'ensemble une augmentation du sucre protéidique, mais quelques résultats contradictoires ont parfois été enregistrés.

L'ablation du pancréas chez le chien provoque une augmentation de la protéidoglycolyse hépatique et une augmentation de la glycémie et de la protéidoglycémie dans tous les territoires vasculaires. Mais la splénectomie a un effet inverse sur les deux glycémies ; associée à la pancréatectomie, elle augmente le sucre libre et diminue le sucre protéidique.

Bierry, Rathery et Bordet [39], en provoquant une néphrite expérimentale, observent une augmentation parallèle de l'azotémie et du sucre protéidique.

Les hormones sont loin d'avoir sur la protéidoglycémie, un effet aussi schématique que sur la glycémie. L'insuline, la thyroxine et l'adrénaline ont sur elle une action souvent contradictoire. Bierry conclut de ses recherches que : « Le métabolisme des glucides est conditionné par un processus de corrélation glandulaire convenablement équilibré et ajusté pour chaque sujet. L'injection d'hormones, la suppression d'une glande, peut intervenir en rompant l'équilibre et déterminer sur les glycémies des variations de sens différents ».

Le lipidoglycoprotéide sérique nous apparaît à la lumière de ces travaux, comme une molécule d'une grande plasticité, qui participe au métabolisme intermédiaire des glucides, des protides et des lipides et subit des remaniements continuels de son édifice architectural. Il est le pivot circulant du métabolisme intermédiaire et, sous le jeu des grands équilibres dynamiques, est entraîné tour à tour vers la polymérisation ou la désintégration. Il représente un réservoir central des principes nécessaires aux synthèses et à l'énergie cellulaire.

Il est bien prouvé qu'en cas de besoin, les tissus les plus variés de l'organisme animal vont profondément modifier l'arrangement moléculaire de la particule protidique du sérum et en extraire les principes vitaux qui leur font défaut. Mais si, dans certains cas extrêmes ou pathologiques, l'ensemble de la molécule peut être ainsi utilisé à des fins plastiques ou énergétiques, il en va sans doute différemment en physiologie normale, où la for-

mule protéique du plasma obéit à la loi fondamentale de Claude Bernard sur la constance du milieu intérieur.

Il est probable que, normalement, seule une fraction du sucre protéidique est utilisable par les tissus. Dumazert et Penet [40] ont récemment donné au sucre protéidique de Lepine un renouveau d'actualité. Il existe en effet une fraction du sucre protéidique qui est libérable par acétolyse ou par l'acide sulfurique très dilué. Elle est sensiblement constante pour une espèce donnée, et comprise entre 0,42 et 0,50 g. p. 100 chez le cheval. Pour ces auteurs, elle représenterait la partie du sucre lié physiologiquement utilisable, disparaissant par glycolyse sanguine au bout de 7 à 8 heures, comme le sucre libre. Elle s'apparenterait au glucide X de Fontes et Thivolle, qui se retrouve dans le filtrat trichloracétique ou tungstique. Le sucre labile ou virtuel, contrairement au sucre solidement fixé sur les protéines, est entièrement fermentescible. Pour Dumazert et Lévy [41], il serait entièrement constitué par du mannose. Ces résultats ne sont d'ailleurs pas en accord avec les travaux de Bierry, qui estime que le galactose est le constituant le plus labile du polyholoside et que la glucosamine est aisément libérée par l'acide chlorhydrique 0,01 N en tube scellé au bain-marie bouillant.

Haptoglobine et Glycoprotéides.

Quelle place doit-on donner à l'haptoglobine dans la gamme des glycoprotéides sériques ? C'est aux travaux de M.-F. Jayle et Abdellatif que nous nous référerons et dont nous donnerons ici les conclusions. Les auteurs recherchèrent s'il était possible d'apparenter l'haptoglobine au globoglycoïde ou au séroglycoïde d'Hewitt, que nous avons définis plus haut. Ils traitèrent un premier sérum de cheval par la méthode d'Hewitt et isolèrent la cristalbumine et le globoglycoïde. Ni l'une ni l'autre de ces deux substances, ne possédaient d'activité haptoglobinique.

D'autres sérums de cheval furent ensuite traités par la même méthode, dans le but d'isoler le séroglycoïde, dont la précipitation coïncida toujours avec celle de l'haptoglobine.

Ces essais furent en outre complétés en utilisant un processus opératoire différent et en s'inspirant de la méthode de précipitation des protéines par les solvants organiques, mise au point par E.J. Cohn et ses collaborateurs [42]. Ce principe de précipitation, extrêmement intéressant, fut inauguré par Mellanby [43], Hardy et Gardiner [44] qui substituèrent un solvant organique tel que l'alcool ou l'acétone, aux sels neutres de la méthode classique d'Hoffmeister. Ces auteurs ont montré qu'en opérant à basse température, au-dessous de 0°, il était possible d'éviter toute dénaturation des protéines. Ils établirent que la précipitation dans ces conditions était fonction de quatre facteurs : le degré alcoolique, le pH, la température et la force ionique. En jouant sur ces quatre variables, il devenait possible de fractionner les protéines plasmatiques avec autant de rigueur qu'en augmentant la molarité d'un sel neutre. La précision du procédé était encore accrue et la dénaturation encore plus faible, en utilisant la technique de la membrane de cellophane rotative, de façon à éviter, à tout moment, la mise en contact d'une concentration alcoolique trop forte avec les protéines.

M.-F. Jayle et Abdellatif utilisèrent cette technique et constatèrent la séparation totale de l'haptoglobine dans la fraction contenant les globulines α.

Ils employèrent également la méthode de Piettre à l'acétone et retrouvèrent l'haptoglobine dans la fraction gélatineuse et pigmentée, dénommée « myxoprotéine » par cet auteur.

On peut donc, en conclusion, retenir de cette étude que :

1°) L'haptoglobine est un glycoprotéide mucilagineux et pigmenté, dont la teneur en hydrates de carbone peut

dépasser 10 p. 100 et qui résulte très vraisemblablement de l'association d'un protéide avec un aminopolyholoside formé de galactose-mannose-glucosamine.

2°) Qu'elle se confond, pour le sérum de cheval, avec le séroglycoïde d'Hewitt ou la myxoprotéine de Piettre et qu'elle appartient à la collectivité des globulines α.

Il est intéressant de noter à ce propos que cette classification fait entrer l'haptoglobine dans la fraction des protéines sériques considérée comme « non spécifique », par opposition à la fraction « spécifique » correspondant aux globulines γ et comprenant les réagines et les anticorps.

Plus récemment, M.-F. Jayle et ses collaborateurs ont présenté les arguments qui militent en faveur de l'existence de polysaccharides libres à côté des glycoprotéides sériques. Ils se rencontrent en particulier dans les fractions de tête et de queue de la précipitation des macromolécules sériques et leur taux s'accentue considérablement au cours de certains états pathologiques. Le premier polysaccharide, appelé « Polysaccharide F » parce qu'il accompagne le fibrinogène, flocule entre les molarités 0 et 1 en phosphate de potassium. Dans les sérums normaux, on n'en trouve que des traces ; dans certains états pathologiques, sa concentration peut dépasser 1 gramme. Le polysaccharide à faible poids moléculaire, appelé « Séromucoïde », n'est que partiellement précipité par les sels et il faut utiliser, pour l'obtenir, de l'acide trichloracétique. Dans les sérums riches en polysaccharides, on trouve plus de 0 g. 50 d'un polyholoside précipitant entre le phosphate de potassium 3M et l'acide trichloracétique, alors que l'azote protéique entraîné dans cette fraction est infime. Dans un cas de néphrite chronique, les auteurs trouvent 1 g. 90 de sucre protéidique sans que la teneur en azote soit plus forte que d'habitude, fournissant ainsi la preuve indiscutable de l'existence de polysaccharides sériques.

De l'ensemble de ce travail, M.-F. Jayle tire une mé-

thode permettant d'établir la formule glycoprotéidique du sérum, qui comprend 7 substances différentes :

1°) Polysaccharide F
2°) Globuline véritable
3°) Globoglycoïde
4°) Albumine véritable
5°) Séroglycoïde
6°) Séromucoïde
7°) Haptoglobine

Sans nous étendre plus avant sur l'intérêt clinique de cette méthode, nous retiendrons simplement que l'haptoglobine se forme aux dépens des glycoprotéides sériques circulants. En effet, la montée de l'indice n'est pas suivie par celle de la concentration en glycoprotéides. Cette absence de parallélisme entre les deux courbes, rapprochée de la constitution chimique de l'haptoglobine, nous incite donc à penser que l'haptoglobine n'est pas constituée de toutes pièces à l'occasion d'un processus évolutif, mais qu'elle résulte de la transformation d'un glycoprotéide α ou β préexistant.

6° Théorie nouvelle sur la constitution enzymatique.

Ainsi que nous l'avons vu dans un précédent chapitre, l'introduction du facteur haptoglobine transforme l'activité pseudo-catalytique de l'hémoglobine en une activité catalytique réelle. La cinétique de la réaction enzymatique du pigment sanguin devient identique à celle des peroxydases vraies. Le pH optimum du complexe « Hb-Hp » se rapproche de celui des peroxydases végétales, l'iode perd son effet inhibiteur, la réaction, qui avait une allure exponentielle avec l'hémoglobine, devient linéaire, c'est-à-dire proportionnelle au temps. Remarquons néanmoins que le complexe « Hb-Hp », qui se comporte comme une peroxydase végétale, conserve toujours la spécificité propre de l'hémoglobine vis à vis de l'hydroperoxyde d'éthylène et de la vitamine C.

Selon M.-F. Jayle [45] l'existence d'un protéide activateur de l'action peroxydasique de l'hémoglobine, semble devoir modifier la conception dualiste qu'avaient G. Bertrand et Willstätter de la constitution des enzymes et, par suite, l'influence des différents constituants du complexe diastasique sur le mécanisme de la catalyse biologique.

L'hématine, en se fixant sur la globine, est orientée d'une façon spécifique vers la catalyse peroxydasique, ayant perdu toute activité catalasique ou oxydasique vraie. Mais ce système binaire « support protéique-groupement actif » ou en d'autres termes « apoenzyme-coenzyme », doit, pour acquérir des propriétés enzymatiques vraies, être complété par une troisième composante, l'haptoglobine qui se fixe équimoléculairement sur l'hémoglobine ou la méthémoglobine « $GlFe^{+++}$ » pour donner le complexe « $GlFe^{+++}$ Hp ». L'haptoblobine n'a pas pour seul effet, comme le composant R de la catalyse minérale, de s'opposer à la destruction de l'hème ou de l'hématine par le peroxyde et, de ce fait, de régulariser la cinétique catalytique. Elle permet, en outre, d'utiliser le composé d'addition « peroxyde-Fer porphyrinique » dans une zone de pH où il est particulièrement instable. Enfin, nous le savons, elle modifie profondément les propriétés physicochimiques du catalyseur, en le soustrayant à la loi d'adsorption de Freundlich et en conditionnant son affinité enzymatique à l'égard des substrats. M.-F. Jayle pense qu'il est possible de généraliser ces données en enzymologie, du moins en ce qui concerne les diastases oxydatives en considérant celles-ci comme des complexes ternaires, constitués par un apoenzyme, un coenzyme et un haptoenzyme.

a) Le *coenzyme*, ici l'hématine, possède déjà en puissance des propriétés oxydasiques, peroxydasiques et catalasiques. Il représente la fraction active qui détermine l'activation du peroxyde en se combinant à lui et, dans un second stade, en donnant un dérivé d'oxydation ins-

table qui conditionne la catalyse. C'est ainsi qu'il donne avec l'eau oxygénée et les hydroperoxydes d'alcoyle un composé d'addition, premier temps de la réaction. Mais, à lui seul, il ne peut pas exploiter cette propriété dans un sens catalytique, c'est-à-dire rythmer à une cadence extraordinairement rapide, les adsorptions et les élutions des substrats. A lui seul, il est incapable d'enchaîner la réaction vers son second stade.

b) l'*apoenzyme*, ici la globine, en dispersant le coenzyme à sa surface et en orientant ses pointes actives, exalte la seule propriété peroxydasique du coenzyme, sans nullement modifier, dans un sens ou dans l'autre, ses propriétés catalasiques ou oxydasiques. Il conditionne donc la spécificité de l'enzyme, l'adsorption du ou des substrats, la rapidité de leur transformation, c'est-à-dire l'instabilité du composé d'addition « Hémoglobine-peroxyde » dans une certaine zone de pH.

c) l'*haptoenzyme*, ici l'haptoglobine, a un rôle de protection et de régulation. Il protège le coenzyme et augmente par suite la résistance du catalyseur. Il permet au système précédent d'exploiter ses propriétés catalytiques dans un zone de pH où il serait rapidement détruit en son absence. Il assure, d'autre part, la régularité de la fixation du substrat réduit et l'élution du substrat oxydé. Il conditionne à la fois la cinétique de la catalyse et la relation linéaire entre la vitesse de la réaction et la concentration de l'enzyme ; en d'autres termes, il rend l'activité du coenzyme proportionnelle à sa concentration, en soustrayant le support colloïdal à la loi des isothermes d'adsorption de FREUNDLICH. L'haptoenzyme est donc avant tout un facteur de protection et d'élution des substrats, qui rend la catalyse indépendante des produits transformés. Sa constitution polyholosidique le différencie nettement de l'apoenzyme qui est de nature strictement protéidique.

Cette nouvelle constitution des peroxydases : « Apoenzyme-Coenzyme-Haptoenzyme », est-il possible de la gé-

néraliser à tous les enzymes ? Il serait sans doute prématuré de répondre par l'affirmative. Il est néanmoins possible de citer quelques présomptions en sa faveur. Les substances polyholosidiques qui constitueraient l'haptoenzyme, sont les ennemies de la cristallisation des protéines. Aussi, cette dernière implique-t-elle leur élimination par des purifications de nature diverse et il y a tout lieu de penser qu'elles restent en majeure partie dans les eaux-mères de cristallisation du produit purifié. Cette dissociation pourrait peut-être expliquer le fait, apparemment paradoxal, que les catalases et les peroxydases cristallisées sont beaucoup moins actives que certaines préparations amorphes. D'autre part, la récente préparation de peroxydase cristallisée, d'un poids moléculaire de 44.000, réalisée par THEORELL, vient également étayer cette conception : elle révèle une haute teneur en hydrates de carbone de ces enzymes (18,3 p. 100), ce qui pourrait expliquer leur comportement catalytique très différent de celui de l'hémoglobine. De nombreux auteurs ont signalé, de leur côté, l'élimination de substances polyholosidiques au cours de la purification de certains enzymes d'oxydation, en particulier du ferment jaune.

Le rôle des différents constituants du complexe enzymatique étant ainsi défini, disons maintenant un mot du mécanisme, selon lequel semble agir le fer hématique dans la réaction catalytique. Récemment l'étude du potentiel d'oxydo-réduction [46] du système méthémoglobine-hydroperoxyde d'éthyle, a révélé l'existence d'un dérivé instable de la méthémoglobine, dont le potentiel est obtenu par la mise en jeu d'un équivalent d'oxydation. Ce dérivé d'oxydation répond donc au passage du fer trivalent de la méthémoglobine à un fer tétravalent. Sa révélation expérimentale permet de mieux saisir le mécanisme intime de la catalyse peroxydasique. Le fer hématique, comme le démontre son étude spectrographique, a la propriété d'additionner une molécule de peroxyde, pour donner naissance à un dérivé rouge violacé, bien étudié par KEILIN et HARTREE [47]. Le peroxyde, acti-

vé par les champs de force de la micelle chromoprotéique, arrache un électron à la couronne périphérique de l'atome ferrique, qui devient apte à le regagner aux dépens d'un substrat hydrogéné. Le fer hématique prend donc une part active à la catalyse, contrairement à l'hypothèse de WIELAND, qui voit en lui un simple moyen de rapprochement des deux protagonistes de la réaction.

CHAPITRE II.

EXPOSÉ TECHNIQUE.

VÉRIFICATION DU MATÉRIEL.

Toutes les pipettes et burettes, tous les ballons jaugés que nous avons utilisés, ont été étalonnés avec soin par les méthodes pondérales habituelles. Pour les micropipettes de 0 cm^3 1 et 0 cm^3 2, nous avons utilisé la méthode préconisée par M. le professeur Fleury.

Nous avons, à cet effet, préparé une solution mère de chlorure de sodium à 250 g. par litre, dont nous avons fait une dilution au 1/100e, et que nous avons très exactement titrée par la méthode de Mohr. La teneur en chlorure de sodium des prises d'essai correspondant aux différentes micropipettes, nous permettait une vérification rigoureuse de ces dernières.

TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'HAPTOGLOBINE.

1° Matériel.

a) Haptoglobinomètre de M.-F. Jayle.

L'haptoglobinomètre (construit par les Établissements Jouan et Cie à Paris), appareil de mesure des indices d'haptoglobine, est un bain-marie muni d'un thermostat

de précision qui, comme le représente la figure 4, est recouvert d'une table métallique percée de deux rangées (A et P) de cinq trous dans lesquels s'engagent des creusets de porcelaine de 30 cm^3 de capacité environ.

D'autre part, deux orifices plus importants permettent

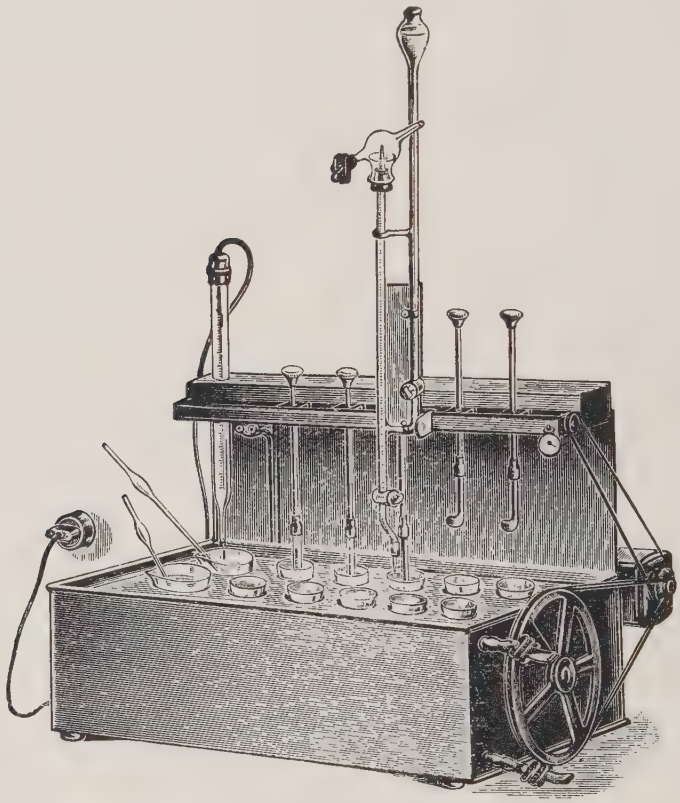

FIGURE 4. — Haptoglobinomètre.

d'introduire des béchers de 500 et 250 centimètres cubes contenant respectivement la solution tampon et la solution d'iodure de potassium. La paroi postérieure du bain-marie est surélevée par une potence supportant à sa par-

tie supérieure une sorte de tablette, d'où partent cinq agitateurs rotatifs individuels, destinés à brasser le contenu des capsules de la rangée postérieure (P). Une burette à zéro automatique de 2 cm³ de Labbé et Neveux est fixée sur un support, qui coulisse sur le rebord intérieur de la tablette. Grâce à son trajet en baïonnette, l'extrémité de la burette peut venir se placer au moment voulu, au-dessus de chacune des cinq capsules de la rangée postérieure (P). Enfin, une lampe convenablement camouflée sous l'étage supérieur de l'appareil permet l'éclairage direct des capsules.

b) Jeu de pipettes.

Il est particulièrement important d'utiliser pour le prélèvement du sérum et de la solution d'hémoglobine, des pipettes de 0,2 cm³, graduées en 1/40^{mes} de cm³. Ces pipettes doivent avoir une extrémité très effilée et un diamètre extérieur de 3 mm. Nous les préférons en tube de verre émaillé.

c) Un chronomètre de précision.

2° Réactifs.

a) Une solution d'hémoglobine M/20.000 en fer hématique, préparée extemporanément à partir d'une solution d'hémoglobine cristallisée de cheval, conservée à la glacière en présence de quelques gouttes de toluène. Cette solution peut se conserver plusieurs mois, si on a soin de ne jamais introduire une pipette dans le flacon. Sa molarité en fer hématique est évaluée par un dosage de ce métal ou par photométrie.

Préparation de l'Hémoglobine cristallisée.

Le sang frais oxalaté de cheval est centrifugé et les globules séparés sont lavés quatre fois avec un volume

égal d'eau physiologique. Trois cents centimètres cubes de globules ainsi obtenus sont refroidis et laqués avec 90 cm³ d'eau distillée et 60 cm³ d'éther (ou 50 cm³ de toluène). Le mélange est vigoureusement agité pendant 5 minutes et centrifugé. On prélève alors avec une pipette la couche inférieure, que l'on introduit dans un bécher plongeant dans un mélange réfrigérant (3 parties de glace et une partie de sel marin). On verse goutte à goutte dans la solution, de l'alcool à 95° jusqu'à une concentration de 20 p. 100. On abandonne dans une glacière vers — 5°. Après quelques heures, les cristaux formés sont essorés, lavés avec de l'alcool à 20 p. 100 également refroidi et repris par le minimum d'eau à 39°, avec addition de 10 centimètres cubes de soude N/10 pour 100 centimètres cubes de solution. Après dissolution, on neutralise exactement avec ClH N/10. On centrifuge et on laisse la solution toute la nuit à la glacière. La solution d'hémoglobine est conservée dans un flacon bouché à l'émeri, sous une mince couche de toluène, à 0°.

Dosage du fer hématique.

Le dosage du fer hématique peut être réalisé par des méthodes très diverses. Nous utilisons de préférence une technique mise au point par M.-F. Jayle et fondée sur l'oxydation de l'acide iodhydrique par le sulfate ferrique, selon la réaction :

$$(SO_4)_3\ Fe_2 + 2\ IH = 2\ SO_4\ Fe + SO_4\ H_2 + I_2.$$

L'iode libéré est titré par l'hyposulfite de soude N/100.

On introduit dans un creuset de porcelaine de 30 cm³ de capacité, 0,5 cm³ de la solution d'hémoglobine cristallisée ou 2 cm³ de sang et 0,2 cm³ de nitrate de magnésium à 50 p. 100. On évapore à sec et l'on porte le creuset muni d'un couvercle dans le four électrique. La température est portée à 600-700° pendant une heure. Après refroidissement, le résidu complètement blanc est repris par 10 à 15 gouttes d'acide sulfurique, 2 gouttes d'acide

nitrique (ces deux réactifs doivent être exempts de fer et de cuivre) et 2 cm³ d'eau distillée. On agite jusqu'à dissolution complète et on évapore sur une toile d'amiante. Les résidus sont repris par 0,5 cm³ de SO_4 H_2 5 N, 4 cm³ d'eau distillée et 2 cm³ d'iodure de potassium à 20 p. 100. L'acide sulfurique, l'eau et la solution d'iodure, ont été privés de gaz par agitation dans le vide. L'iode est libéré rapidement et on le titre au bout d'une minute en présence d'empois d'amidon, par l'hyposulfite de soude N/100, dont 1 cm³ correspond à 0,00066 g. de fer. Un atome de fer (56 g.) correspond à 17.000 g. d'hémoglobine environ.

b) Une solution d'hydroperoxyde d'éthyle (N/10 dans la méthode classique), préparée à partir d'une solution mère normale dont le titrage iodométrique doit être refait tous les mois. L'hydroperoxyde d'éthyle est préparé par la technique de Bayer et Villiger [48] modifiée par Rïeche [49].

Titrage du peroxyde.

On introduit dans une capsule de porcelaine : 0,1 cm³ de peroxyde, 2 cm³ d'une solution d'iodure de potassium à 20 p. 100 conservée dans un flacon jaune et 2 gouttes d'acide acétique pur. On prépare 3 échantillons identiques qu'on laisse reposer 4 heures à l'obscurité. On titre alors l'iode dégagé, par l'hyposulfite N/100, en présence d'empois d'amidon et on prend la moyenne des trois résultats trouvés, à condition toutefois qu'ils soient très voisins.

c) Une solution tamponnée d'acétate de sodium (à pH 4,4 pour la méthode classique),obtenue en mélangeant une solution N/10 d'acide acétique (6 g. par litre) et une solution M/10 d'acétate de sodium R.P. (13,6 g. par litre).

On ajoute à 315 cm³ de la deuxième solution, 685 cm³ de la première. Le pH est vérifié soit électrométrique-

ment, soit colorimétriquement au moyen du vert de bromocrésol.

d) Une solution d'iodure de potassium R.P. (M/10 dans la méthode classique, soit 16,6 g. d'iodure par litre).

e) Une solution titrée et fraîche d'hyposulfite de sodium N/100, que l'on introduit dans la microburette.

f) Une solution d'empois d'amidon soluble à 2 p. mille.

g) Une solution titrée d'iode N/100.

h) Le sérum ou le plasma citraté ou oxalaté du sujet. Il est essentiel d'opérer avec du sérum ou du plasma non hémolysé. En raison de la stabilité de l'haptoglobine, on peut, à la rigueur, utiliser le sérum prélevé depuis deux ou trois jours et conservé à la glacière.

Il est important de renouveler souvent les réactifs et de se méfier de l'évaporation qui se produit et qui les concentre rapidement après introduction dans les béchers de l'haptoglobinomètre. Les solutions d'hémoglobine, d'iode et d'hyposulfite, seront préparées quotidiennement à partir de solutions-mères de titre rigoureusement contrôlé (décinormal pour l'iode et l'hyposulfite). La solution de peroxyde n'est refaite que tous les deux jours à partir de la solution mère.

Les réactions enzymatiques exigent des manipulations excessivement précises et un contrôle strict des burettes et pipettes utilisées, afin de maintenir des conditions expérimentales toujours identiques.

3° Dosage de l'haptoglobine.

A. — Technique d'activation de M.-F. Jayle.

C'est la technique couramment utilisée pour les dosages en série.

On dispose, dans l'haptoglobinomètre réglé à 32°, deux séries de cinq creusets de porcelaine. Dans tous les creusets de la série postérieure, on introduit 0,1 cm^3 de la solution d'hémoglobine M/20.000.

Les 4 premiers creusets reçoivent, en outre, 1/20 de cm³ d'un sérum dilué au 1/2, le cinquième creuset servant de témoin.

On mélange avec soin.

Dans les creusets de la série antérieure, on introduit sucessivement 1 cm³ de peroxyde N/10 et 10 cm³ de la solution d'acétate tamponnée à pH 4,4. Dans les capsules de la série postérieure, on ajoute 3 cm³ de la solution d'iodure.

Avant de verser dans la capsule 1 de la série postérieure, la capsule correspondante de la série antérieure, on ajoute à celle-ci 0,5 cm³ de la solution d'iode N/100. On met les agitateurs en marche et, au moment du mélange, on met en route le chronomètre.

Le mélange des capsules 2 se fait au temps 1 minute, après avoir ajouté au dernier moment la même quantité d'iode et ainsi de suite jusqu'aux capsules 5 qui sont mélangées au temps 4 minutes.

A 4 minutes 15 secondes, 2 gouttes de la solution d'empois d'amidon sont versées dans la capsule 1 et on commence la titration à 4 minutes 30 secondes, de façon à la terminer à 5 minutes exactement.

Le temps est rigoureusement répété pour les autres capsules et l'opération sera entièrement terminée à la fin de la neuvième minute.

Pour observer le virage avec précision, il est nécessaire d'éclairer convenablement les récipients de porcelaine blanche.

Pour tous les résultats supérieurs à 1,7 cm³ d'iode N/100, on procèdera à la dilution du sérum au 1/3, au 1/4 ou même davantage, de façon à obtenir un dégagement inférieur à ce chiffre.

Pour traduire les résultats en indice d'haptoglobinémie, on retranche de chaque résultat, l'iode dégagé par le témoin, qui se situe entre 0,73 et 0,75 d'iode N/100 (capsule 5), si tous les réactifs sont exacts. On rapporte alors à 0,05 cm³ de sérum pur, en multipliant par le coefficient de dilution.

Il est important de temps à autre de vérifier les résultats, en appliquant pour un sérum d'activité moyenne de l'ordre de 2 unités d'indice d'haptoglobinémie, la technique de saturation ; mais ce n'est pas là une mesure absolument indispensable, si l'on est certain de l'exactitude des réactifs utilisés et si l'on a vérifié avec soin la température du bain-marie, le pH de la solution tampon (au vert de bromocrésol) et le titre du peroxyde.

En effet, les conditions expérimentales de cette technique ont été établies de telle façon que les indices mesurés correspondent rigoureusement à ceux que l'on trouve en appliquant la technique suivante, qui représente la méthode étalon. Il est utile de contrôler une fois par semaine la concordance des deux méthodes sur un même sérum, afin de s'assurer que l'hémoglobine n'est pas altérée. Quand la solution d'hémoglobine est contaminée ou trop vieille, les mesures deviennent inexactes.

B. — Technique de saturation de M.-F. Jayle.

Dans cette technique, on réalise une véritable détermination de la molarité de l'haptoglobine, en posant arbitrairement qu'une molécule d'haptoglobine, correspond à un atome-gramme de fer hématique. On recherche la quantité de sérum ou de plasma nécessaire pour saturer 0,1 cm³ d'une solution d'hémoglobine M/20.000 en fer hématique.

L'opération peut être conduite à la température du laboratoire, à condition que celle-ci soit proche de 20°, mais une température de 25° dans un thermostat est préférable. Le matériel et les réactifs sont identiques à ceux qui sont indiqués plus haut. On dispose sur deux rangées, dix creusets de porcelaine. On introduit dans chaque capsule de la série postérieure la même quantité d'hémoglobine cristallisée de cheval : 0,1 cm³ d'hémoglobine mesuré avec une grande précision, à l'aide d'une micropipette graduée en 1/100 de cm³. Dans les capsules 1, 2,

3, 4, on ajoute des quantités croissantes de sérum pur ou dilué. Si l'indice du sérum mesuré par la technique d'activation est inférieur à 1, on pourra utiliser le sérum pur. De 1 à 2, il sera dilué au 1/2, de 2 à 3, au 1/3, etc... Il est recommandé d'utiliser pour cette mesure un sérum dont l'indice est supérieur à 1,5 pour obtenir un étalonnage précis, car la dilution diminue les causes d'erreur. Prenons comme exemple un sérum dont l'indice trouvé par la méthode d'activation est égal à 1,6. Le sérum est dilué au 1/2 et on en introduit dans les capsules n^{os} 1, 2, 3, 4 : 0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; et 0,20 cm^3. La capsule 5 ne reçoit pas de sérum et représente le témoin de la réaction.

L'opération est ensuite rigoureusement conduite comme dans la technique précédente.

On trouvera par exemple les résultats suivants, exprimés en iode N/100 :

1er creuset	1,48
2^e creuset	2,35
3^e creuset	2,65
4^e creuset	2,60
5^e creuset	0,70

On retranche des premiers résultats celui qui est fourni par le témoin, soit 0,70 cm^3. Ils deviennent :

1°	0,78
2°	1,55
3°	1,95
4°	1,90

On constate de la sorte, que la quantité d'iode dégagé dans la capsule n° 2 est le double de celle trouvée dans la première capsule (0,78 cm^3), alors qu'elle est identique pour les capsules 3 et 4. Or la différence entre la 2^e et la 3^e titration n'est que de 0,40, ce qui signifie que la saturation de l'hémoglobine présente est obtenue ici entre la 2^e et la 3^e capsule, c'est-à-dire entre 0,10 et 0,15 cm^3 de sérum dilué. Pour calculer le point de saturation, il suffit d'appliquer une simple règle de trois :

0,78 cm³ Iode N/100 correspondant à 0,05 cm³ de sérum dilué au 1/2,

0,4 cm³ correspondent à $\frac{0,05 \times 0,4}{0,78} = 0,026$ cm³ de sérum dilué au 1/2.

Le point de saturation correspond donc à 0,1 + 0,026 cm³ de sérum au 1/2 ou à 0,063 de sérum pur. Cela signifie, par suite de la convention arbitraire établie plus haut, que 0,063 cm³ du sérum a une concentration moléculaire d'haptoglobine correspondant à 0,1 cm³ d'une solution d'haptoglobine M/20.000. On en déduit que la concentration moléculaire du sérum en haptoglobine est de M/12.658. Afin de simplifier ce résultat, on le traduit en indice d'haptoglobinémie, en posant que l'unité de cette échelle égale 1/20.000 de molécule d'haptoglobine. En pratique, on fait un raisonnement beaucoup plus simple pour traduire directement le résultat obtenu en indice : il suffit de diviser 0,1 par le chiffre de la saturation calculé comme nous venons de l'indiquer : nous aurons dans le cas particulier : $\frac{0,1}{0,063} = 1,58$.

Si les résultats trouvés avec les deux techniques diffèrent de moins de 10 p. 100, on pourra estimer que leur correspondance est satisfaisante. Dans le cas contraire, il sera nécessaire de vérifier le titre des réactifs utilisés dans la technique d'activation. Evidemment, l'étalonnage réalisé par la méthode de saturation n'aura de valeur que si l'on a utilisé de l'hémoglobine fraîchement préparée et un sérum ne présentant pas trace d'hémolyse.

TECHNIQUES DE PRÉCIPITATION PAR LES SELS NEUTRES.

Dans un premier temps, on prépare une solution saturée du sel utilisé. Le sel est dissous en excès et à chaud dans une quantité d'eau calculée et, après filtration, le

pH est amené à 7 par la base correspondant au cathion.

La préparation de la solution de phosphates est plus délicate. On pèse des quantités de phosphates monopotassique et bipotassique purs correspondant à la molarité 3,5 M. Ainsi, pour la préparation de deux litres du réactif, on procède comme suit : on pèse 476 grammes de $PO_4 H_2 K$ et 609 grammes de $PO_4 H K_2$. Au sel monopotassique, on ajoute assez d'eau pour que le volume final soit de 1.200 cm³, alors que pour le sel bipotassique, plus soluble, il ne sera que de 800 cm³. Les deux solutions sont portées séparément à l'ébullition, mélangées à chaud et, après refroidissement, amenées à 2 litres dans un ballon jaugé. On a ainsi une solution équimoléculaire de phosphates mono et bipotassiques à la molarité de 3,5 et de pH = 6,9.

Pour nos expériences, nous avons en outre préparé des solutions de phosphates dont le pH est respectivement de 6,05 et de 7,9, en mélangeant, d'une part :

Solution de $PO_4 H_2 K$ 3,5 M.....	9 volumes
Solution de $PO_4 H K_2$ 3,5 M.....	1 volume

et d'autre part :

Solution de $PO_4 H_2 K$ 3,5 M.....	1 volume
Solution de $PO_4 H K_2$ 3,5 M.....	9 volumes

Le fractionnement proprement dit a été réalisé par deux méthodes différentes. Dans la première, on mélange sans précautions le sérum et la quantité d'eau et de solution saline nécessaire pour obtenir la molarité recherchée. On laisse reposer dix heures à la température du laboratoire et on filtre. Dans la seconde méthode, on mélange préalablement le sérum et l'eau, que l'on introduit dans un fractionneur mis au point par Abdellatif et dont nous reproduisons le schéma (fig. 5).

La solution saline est versée dans l'ampoule à brome et s'écoule très lentement (1 goutte toutes les 5 secondes environ) dans la lumière de l'agitateur qui la diffuse dans le sérum dilué. On évite ainsi la production de zones de concentration et on réalise une diffusion qui se rap-

proche de celle que permet la membrane de collodion rotative du procédé de E. J. Cohn et Mc. Meekin. Quand la totalité de la solution est introduite, on laisse reposer cinq heures à la température choisie, pour que l'équilibre se fasse et on filtre.

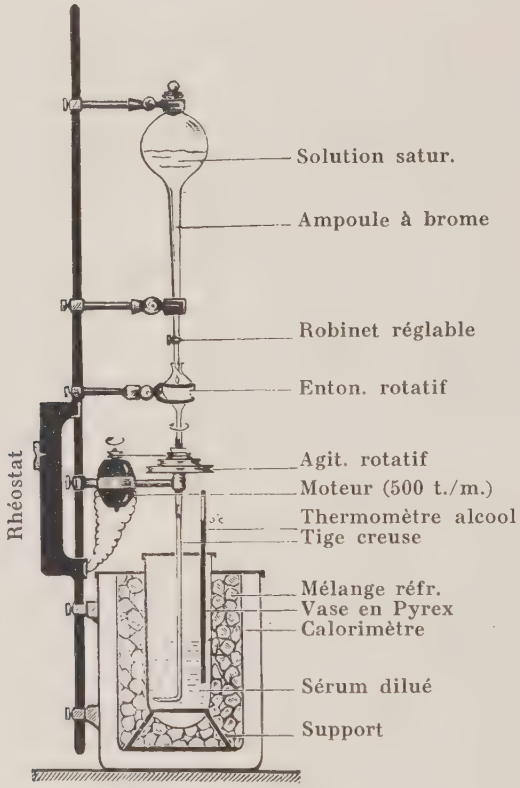

Figure 5.

Quelle que soit la modalité du fractionnement, on effectue séparément une série d'opérations à molarités croissantes. Par exemple, dans chacune d'elles, on part de 1 cm³ de sérum dilué auquel on ajoute une quantité suffisante de réactif salin pour amener le volume à

10 cm³ et réaliser ainsi une gamme de concentrations salines à la dilution de 1/10. Dans chaque filtrat, on détermine la quantité d'haptoglobine restante et, en multipliant les essais, on peut tracer la courbe de sa floculation en fonction de la concentration saline. Cette dernière peut être exprimée sous trois formes différentes, soit en molarité, soit en pourcentage de saturation (x p. 100), soit encore en indice de saturation dont l'unité représente la saturation saline.

Dans nos expériences, nous avons eu pour but de rechercher si l'allure des tracés de précipitation indiquait l'homogénéité ou l'hétérogénéité de l'haptoglobine. Nous avons également eu pour objectif, de préciser la zone de précipitation de cette substance dans des sérums de provenances diverses. Mais la spécificité du dosage de l'haptoglobine nous ouvrait une autre possibilité à laquelle nous nous sommes spécialement attaché : celle d'étudier les modalités de la floculation d'une protéine définie, en présence d'une collectivité hétérogène d'autres protéines. On connaît en effet la loi de Cohn, qui régit la précipitation d'une protéine homogène par un sel neutre et qui s'exprime par l'équation :

$$\text{Log. } S = \beta' - K's\ \Gamma/2$$

$\Gamma/2$ représente la force ionique de la solution et peut être remplacé par la concentration saline.

On possède peu d'informations sur l'influence respective des différentes protéines coexistant dans un mélange, sur la floculation de l'une d'entre elles. Le tracé affecte-t-il toujours dans ce cas une allure logarithmique ? La dilution et le mode d'introduction de la solution saline sont-ils sans influence comme dans le cas de la loi de Cohn ? En est-il de même de la température et du pH qui, on le sait, ne modifient nullement la constante de précipitation K's, mais la solubilité maxima de la protéine β' ? C'est pour résoudre tous ces problèmes que nous avons fait varier, dans nos expériences, le sel uti-

lisé, la température, la dilution et le pH, ainsi que le mode d'introduction de la solution saline.

TECHNIQUE DE DOSAGE DU SUCRE PROTEIDIQUE.

Le dosage du sucre protéidique a été effectué par la technique de Sörensen et G. Haugaard, modifiée et adaptée à l'électrophotomètre de Meunier par M.-F. Jayle et O. Judas.

CHAPITRE III.

RECHERCHES PERSONNELLES.

PREMIÈRE PARTIE.

ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS FACTEURS INTERVENANT DANS L'ACTION CATALYTIQUE DU COMPLEXE HAPTOGLOBINE-HÉMOGLOBINE.

Nous avons recherché s'il était possible d'améliorer la précision du dosage classique de l'haptoglobine, en modifiant la concentration des réactifs, le pH et la température de la réaction. En effet, quand on précipite par les sels neutres les protéines sériques, la concentration de l'haptoglobine dans les filtrats subit une diminution progressive du fait de la dilution et surtout de sa précipitation fractionnée. Aussi, cette concentration devient-elle très faible dans les prises d'essai quand on approche du terme de la précipitation et son évaluation est donc fonction de la précision de la technique utilisée. A un autre point de vue, l'étude systématique des conditions expérimentales de la technique nous a donné l'occasion d'observer l'influence des différents facteurs sur la réaction.

1° Influence de la dilution sur la combinaison Hb-Hp.

La dilution préalable de la solution d'hémoglobine (Hb) influence-t-elle la combinaison du pigment sanguin et de l'haptoglobine (Hp) ? Pour cette étude, nous avons ajouté une même quantité de sérum, soit 0,05 cm^3 d'un sérum dilué au 1/4, à 0,1 cm^3 d'hémoglobine M/20.000 en fer

hématique, diluée par addition d'eau de 0,1 cm³ à 5 cm³. On ajoutait ensuite à tous les essais une quantité d'eau suffisante pour obtenir un volume constant. Les résultats ont été identiques dans tous les cas étudiés, ce qui signifie que la combinaison de mêmes quantités d'hémoglobine et d'haptoglobine n'est nullement influencée quand on fait varier la dilution de 1 à 50.

2° Influence de SO_4 $(NH_4)_2$ sur la réaction peroxydasique.

Nous avons recherché l'influence inhibitrice du sulfate d'ammoniaque sur l'activité peroxydasique du complexe « Hb-Hp », à des molarités en SO_4 $(NH_4)_2$ allant de 0 à 0,8 toutes les conditions expérimentales étant égales par ailleurs. La solution saturée de SO_4 $(NH_4)_2$ était ajoutée, en quantités calculées, à la capsule contenant la solution tampon et le volume était amené à 20 cm³ par addition d'eau. Les résultats sont consignés sur le tableau I.

TABLEAU I.

Action inhibitrice de SO_4 $(NH_4)_2$ sur l'activité peroxydasique du complexe Hb-Hp.

Molarités en SO_4 $NH_4)_2$	0	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80
Indice d'Haptoglobine	1,77	1,65	1,35	1,15	1,05	0,80	0,50	0,15	0
Inhibition en pourcentage.....	0	6,7	23,7	35	41	54,8	71,7	91,5	100

On constate que le sulfate d'ammoniaque n'a qu'un pouvoir inhibiteur relativement faible, n'entraînant à la molarité 0,10, qu'une diminution d'activité de 6,7 p. 100. Dans nos essais expérimentaux, nous n'avons pas dépassé la molarité 0,03 ce qui correspond à une addition de 0,15 cm³ de la solution saturée de SO_4 $(NH_4)_2$ et, dans ces conditions, l'inhibition entraînée par le sulfate d'am-

moniaque est pratiquement négligeable, n'excédant pas 2 p. 100. Néanmoins nous en avons tenu compte, en amenant la concentration saline à cette molarité dans tous essais.

3° Tamponnement de la réaction.

Le tamponnement de la réaction s'effectue par 10 cm³ de solution acide acétique — acétate M/10. Nous avons vérifié que l'addition de la solution de peroxyde ne modifiait nullement le pH.

4° Influence de la concentration en iodure de potassium.

Les conditions expérimentales étaient les suivantes : température 37°, pH 4,4 volume final 20 cm³. Nous avons

FIGURE 6. — Influence de la concentration en IK sur l'activité peroxydasique.

Ordonnée : Activité peroxydasique exprimée en indices d'haptoglobine (Hi).

Abscisse : Molarité de la solution en IK.

fait varier la concentration en iodure de potassium de 0,00375 M à 0,15 M. La forme de la courbe (fig. 6) est celle d'une hyperbole équilatère. Pour une concentration M = 0,075, l'indice d'haptoglobine Hi calculé est de 4,10, alors que, quand on double la concentration en iodure (M = 0,15) il n'est que de 4,25.

Pour une concentration 10 fois plus faible (M = 0,015), il est encore de 3,50. On voit sur la figure 6 que la courbe tend rapidement vers un maximum. C'est la raison pour laquelle on utilise habituellement 3 cm³ d'iodure M/10, correspondant à la molarité 0,015.

5° Influence de la concentration en peroxyde.

Les conditions expérimentales étaient les suivantes : température 37°, pH 4,4, volume final 20 cm³, IK 0,015 M. Nous avons fait varier la normalité de la solution de peroxyde de N/40 à 4 N, ce qui correspondait à une normalité du milieu de la réaction allant de 0,00125 N à 0,2 N ou, en molarité, de 0,000625 à 0,1 M. On constate sur la figure 7, que la forme générale de la courbe d'acti-

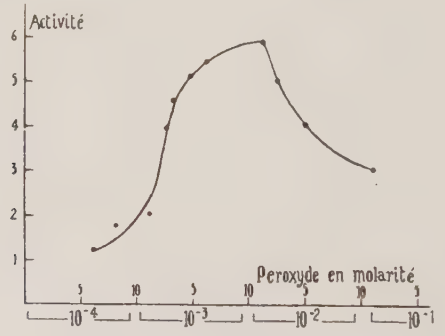

FIGURE 7. — Influence de la concentration en peroxyde sur l'activité du complexe Hb-Hp).
Ordonnée : Activité peroxydasique exprimée en Hi.
Abscisse : Peroxyde en molarité.

vité du complexe Hémoglobine-Haptoglobine (Hb-Hp) en fonction de la concentration moléculaire du peroxyde,

correspond bien à la loi de MICHAELIS. Le maximum d'activité est obtenu pour une concentration molaire qui est égale à $1,25 \times 10^{-2}$ et correspond à un indice d'haptoglobine Hi = 5,90. L'affinité du peroxyde pour le complexe enzymatique Hb-Hp, correspond à la concentration en peroxyde qui donne la moitié de l'activité maxima. Elle est ici de $1,8 \times 10^{-3}$, pour une activité Hi = 2,95.

Ce résultat est particulièrement intéressant du point de vue théorique, car M.-F. JAYLE et SAID ISHAK [50] ont confirmé le travail de WILLSTÄTTER et POLLINGER [51] et ont établi que, dans le cas de l'hémoglobine, l'inhibition du catalyseur ne se produisait pas pour des concentrations élevées en peroxyde et qu'à la loi de MICHAELIS se substituait celle des isothermes d'adsorption de FREUNDLICH, établissant un rapport direct entre le logarithme de la concentration du peroxyde et le logarithme de l'activité enzymatique de l'hémoglobine (Figure 1). Conformément à la théorie émise par M.-F. JAYLE sur la constitution ternaire du complexe enzymatique d'une peroxydase, il a suffi de combiner l'hémoglobine à l'haptoglobine pour transformer une pseudoperoxydase en une peroxydase vraie obéissant à la loi de MICHAELIS.

On pouvait néanmoins se poser la question du rôle joué dans cette inhibition par l'action oxydante du peroxyde aux concentrations élevées. Nous avons donc fait les expériences suivantes : dans un premier temps, le complexe Hb-Hp a été mis en contact pendant cinq minutes avec des concentrations en peroxyde allant de 0 à 0,05 M. Après ce temps, on a ajouté l'iodure et la quantité complémentaire de peroxyde et de solution tampon, pour

TABLEAU II.

Molarités en peroxyde	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
Iode dégagé en 5 minutes ..... (Témoin déduit)	88	51	51	51	51	51

amener le volume à 20 cm³ et la concentration du peroxyde à 0,000625 M. Le tableau II relate les résultats en cm³ d'iode N/100 libéré pendant cinq minutes, déduction faite du témoin. Il indique que la destruction du complexe Hb-Hp qui se produit pendant les 5 minutes de contact avec le peroxyde, est une constante qui est indépendante de la concentration en ce substrat. Cette constatation nous permet de lier la diminution de l'activité peroxydasique au-delà de la molarité 0,0125 à une inhibition réelle du complexe enzymatique par le substrat et non pas à une destruction de l'enzyme.

6° Influence du pH.

La figure 8 représente les courbes d'activité pH pour différentes concentrations en iodure et en peroxyde à la température de 37°. Le pH optimum n'est pas influencé

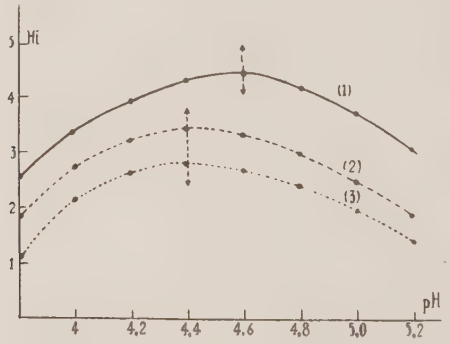

FIGURE 8. — Influence du pH sur l'activité de « Hb-Hp » pour différentes concentrations en iodure (2 et 3) et en peroxyde (1 et 2).

par la concentration en iodure et se situe à 4,4 quand la molarité de l'iodure varie de 0,015 M à 0,075 M (courbes n°ˢ 2 et 3). Par contre, il se déplace vers l'alcalinité lorsqu'on augmente la concentration du peroxyde et passe de 4,4 à 4,6 quand on double la concentration en peroxyde (courbe n° 1).

On sait que la température influence également le pH optimum et que pour une molarité de peroxyde N/150, à 32°, il se situe à pH 4,2 [52].

Le pH optimum ne peut donc pas être considéré comme une caractéristique de l'enzyme, mais bien comme une notion relative, placée sous la dépendance de plusieurs facteurs.

7° Influence de la température au pH optimum.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Iodure de potassium 0,015 M.
Peroxyde 0,0025 M,
pH = 4,4, dans un premier essai.

et :

Iodure de potassium 0,075 M
Peroxyde 0,005 M,
pH = 4,6, dans le second essai.

L'optimum de la courbe d'activité (Fig. 9 A.) en fonction de la température, se situe à 37°, soit à la température du corps. Entre 10° et 37°, le coefficient d'augmen-

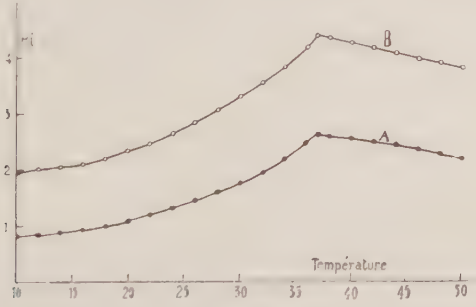

FIGURE 9. — Influence de la température sur l'activité de Hb-Hp.

tation de la vitesse de la réaction demeure voisin de 1,5. On remarque la pente très douce de la partie descendante de la courbe entre 37° et 50°. Elle indique une bonne résistance de l'enzyme à l'effet destructif de la température. La même opération a été réalisée pour des concentra-

tions beaucoup plus fortes en iodure et en peroxyde, respectivement de 0,075 M et de 0,005 M, à pH 4,6. La figure 9 B est superposable à la précédente, avec même optimum à 37° et même coefficient de Van t'Hoff, ce qui ressort du parallélisme des portions ascendantes des deux courbes.

8° Recherche des conditions expérimentales permettant de doubler approximativement l'activité peroxydasique, par rapport à celle réalisée dans la technique d'activation de M.-F. Jayle.

L'étude systématique de l'influence des différents facteurs sur l'activité du système enzymatique, n'avait pas un seul but théorique, mais également un intérêt pratique pour notre travail expérimental : celui de rechercher s'il était possible de sensibiliser la méthode, tout en conservant sa rigueur. Nous avons donc tout d'abord recherché les conditions permettant d'obtenir un dégagement d'iode approximativement deux fois plus élevé que dans la technique habituelle décrite page 56. En nous référant aux résultats relatés dans les paragraphes précédents, nous avons abouti par tâtonnement aux conditions expérimentales suivantes :

pH = 4,4
Température = 37°
IK = M/2
Peroxyde = N/5
Volume final = 20 cm³.

TABLEAU III.

Indices d'Haptoglobine	Sérums	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Technique habituelle.....	1	2,10	1,50	3,12	1,80	2,40	1,9	2,8	3,40
	Technique sensibilisée	1,9	4,20	3	6,15	3,60	4,70	3,80	5,50	6,80

Le tableau III donne la mesure comparative des indices d'haptoglobine de neuf sérums différents, par la technique habituelle et par notre technique sensibilisée. On voit qu'ils varient bien du simple au double, résultat recherché.

9° Etude de l'activité peroxydasique en fonction de la concentration du complexe enzymatique « Hb-Hp ».

M.-F. Jayle [53] a établi en utilisant des sérums humains pathologiques, que dans les conditions expérimentales décrites page 58, de sa technique de saturation, il existe une proportionnalité linéaire entre l'activité du système enzymatique et la concentration du complexe « Hb-Hp », quand la quantité d'iode centi-normal dégagé pendant cinq minutes n'excède pas 2 cm³. Nous avons, par la technique habituelle, déterminé les quantités d'iode dégagé, en ajoutant à 0,10 cm³ d'hémoglobine M/20.000 en fer hématique, des quantités d'un sérum de cheval allant de 0,001 cm³ à 0,05 cm³. On remarque sur la figure 10 que la saturation de l'hémoglobine se situe à 0,035 cm³

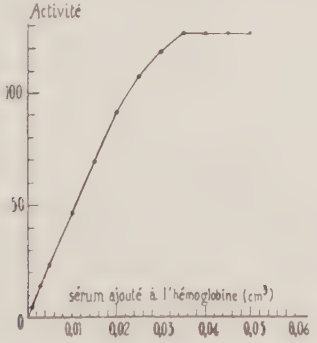

Figure 10. — Activité peroxydasique de l'hémoglobine en fonction de quantités croissantes de sérum de cheval. Technique habituelle.

Ordonnée : Activité du système exprimée en Hi.
Abscisse : Quantités de sérum ajoutées à l'hémoglobine en centimètres cubes.

de sérum. Au delà, les quantités d'iode dégagé restent fixes et égales à 2,05 cm³, d'où il faut retrancher le témoin égal à 0,79 cm³, soit, en définitive, 1,26 cm³. Mais le tracé entre le point de saturation et la rencontre des coordonnées n'est rigoureusement linéaire que pour des quantités d'iode inférieures ou égales à 1,7 — 0,79 = 0,91 cm³ d'Iode N/100, dans le cas du sérum de cheval. Signalons d'ailleurs, que la proportionnalité linéaire entre l'activité et la concentration enzymatique peut, pour certains sérums, être plus étendue. Néanmoins, dans la pratique des mesures de Hi par la méthode d'activation, il est recommandé de ne pas dépasser un dégagement d'iode N/100 de 1,7 cm³, pour le calcul direct de la concentration en haptoglobine.

Les résultats permettent de se faire une idée de la sensibilité très remarquable de la méthode, puisqu'avec 0,003 cm³ d'un sérum dont l'indice Hi = 2,3, les points sont encore sur le tracé linéaire. Cela signifie que, lorsqu'on calcule l'indice à partir des activités mesurées entre 0,003 et 0,02 cm³, on retrouve rigoureusement un indice égal à 2,3. Avec 0,001 cm³, on ne trouve plus qu'un indice de 2. Le point expérimental s'écarte légèrement du tracé. On est à la limite de la sensibilité de la méthode.

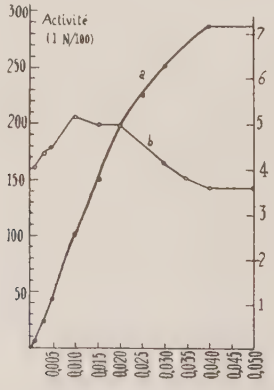

FIGURE 11.

Nous avons ensuite appliqué à la même gamme de ce sérum chevalin, la technique sensibilisée. Le tracé (a) de la figure 11 représente les quantités d'iode dégagé en fonction des quantités croissantes de sérum mises en réaction. Le tracé (b) de la même figure représente les différents indices d'haptoglobine calculés et ramenés à 0,05 cm^3 de sérum initial. L'aspect incurvé du premier et la ligne brisée figurant le second, se passent de commentaires en indiquant, en dehors d'un court segment, l'absence de proportionnalité rigoureuse entre l'activité et la concentration enzymatique dans ces conditions expérimentales. Cette méthode s'est donc révélée inutilisable pour nos recherches.

Malgré cet échec, nous ne nous sommes pas tenu pour battu et, en nous plaçant à 32° et à pH 4,4, nous avons, dans toute une série d'opérations qui sont mentionnées sur le tableau IV, recherché les concentrations en peroxyde et en iodure, pour lesquelles nous étaient garanties, à la fois, la sensibilité de la méthode et la proportionnalité entre l'iode dégagé et le sérum ajouté. Il fallait, d'autre part, satisfaire aux conditions suivantes :

1°). — Avoir un volume total de 20 cm^3, alors que, dans la méthode habituelle, il n'est que de 14,15 cm^3. Cette marge de 5 cm^3 était nécessaire pour l'addition à l'hémoglobine diluée, de filtrats riches en sulfate d'ammoniaque ou en phosphate de potassium.

2°). — Maintenir la proportionnalité entre sérum et activité du système, en présence de sels neutres ajoutés. L'expérience prouve que ce résultat n'est obtenu qu'en maintenant la concentration du peroxyde à la décinormalité et en portant la molarité de l'iodure à M/5 au lieu de M/10. Dans ces conditions, les résultats ne sont troublés ni par addition de sulfate d'ammoniaque, ni par addition de phosphate de potassium. Comme nous l'avons vu, le sulfate d'ammoniaque est un inhibiteur de la réaction. Aussi n'avons-nous pas dépassé les prises d'essai correspondant à 0,15 cm^3 d'une solution saturée en ce

TABLEAU IV.

Indices d'haptoglobine en fonction des quantités de sérum ajoutées à 0,1 cm³ d'hémoglobine M/20.000 à 32° et à pH 4,4 pour des concentrations variables en peroxyde et en iodure.

Quantités de sérum mises en réaction				0,001	0,003	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035
Volume final	Sels neutres ajoutés	Iodure	Peroxyde									
20 cm³	0	M/2	N/10	2,4	2,6	2,8	2,7	2,53	2,55	2,32	2,26	2,28
20 cm³	0	M/10	N/5	1,90	2	2,3	2,5	2,26	2,45	2,28	2,30	2,05
20 cm³	0	M/5	N/7,5	2,60	2,8	2,8	2,8	2,8	2,75	2,60	2,45	2,45
20 cm³	1 cm³ Phosphates 2,8 M	M/5	N/7,5	2,80	3	3,20	3	2,90	2,75	2,70	2,50	2,50
20 cm³	0	M/5	N/10	1,80	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,88	1,80	1,75
20 cm³	1 cm³ Phosphates 2,8 M	M/5	N/10	2	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,10	1,95	1,90
20 cm³	0,15 $SO_4(NH_4)_2$ saturé	M/5	N/10	1,75	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,83	1,75	1,70
20 cm³	0	M/10	N/10	1,45	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,55	1,50	1,45
20 cm³	1 cm³ Phosphates 2,8 M	M/10	N/10	1,70	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,70	1,65	1,60
20 cm³	0,15 $SO_4(NH_4)_2$ saturé	M/10	N/10	1,40	1,55	1,55	1,55	1,55	1,55	1,50	1,45	1,40
14 cm³,15	0	M/10	N/10	1,70	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,70	1,65	1,60
14 cm³,15	1 cm³ Phosphates 2,8 M	M/10	N/10	1,90	2	2	2	2	2	1,90	1,85	1,80
14 cm³,15	0,15 $SO_4(NH_4)_2$ saturé	M/10	N/10	1,65	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,65	1,60	1,55

sel. L'indice, dans ces conditions, n'est que très légèrement diminué et la forme du tracé non modifiée. Le mélange équimoléculaire PO_4H_2K + PO_4HK_2 à pH = 6,9 agit en sens inverse et fonctionne comme activateur de la réaction. Evidemment, le pouvoir tampon de ce mélange nous a contraint, pour maintenir le pH à 4,4, de modifier la composition de la solution acétate, en ajoutant à 1.000 cm³ du tampon acétate M/10 à pH 4,4, une quantité d'acide acétique égale à 19,643 grs. Un centimètre cube de la solution équimoléculaire de phosphates mono et bipotassiques à 2,8 M, ajouté à 10 cm³ de cette nouvelle solution, ramène le pH à 4,4. Pour maintenir dans chaque expérience, ainsi que dans le témoin, des concentrations salines et un pH constants, nous dûmes calculer, pour chaque opération, la quantité de phosphate de potassium complémentaire à ajouter avant le mélange du contenu des deux capsules. Les mêmes précautions furent prises pour le sulfate d'ammoniaque, afin d'avoir des résultats comparatifs.

Si nous considérons dans le détail le tableau IV, nous constatons que, pour les formules Iodure M/2 et peroxyde N/10 d'une part, Iodure M/10 et peroxyde N/5 d'autre part, la proportionnalité est défectueuse. Par contre les indices Hi obtenus pour l'iodure M/5 et le peroxyde N/7,5 sont satisfaisants, jusqu'à concurrence de 0,02 cm³ de sérum. Mais l'addition de phosphates dans ces conditions fait monter l'indice à plus de 3 et supprime la proportionnalité recherchée.

C'est pourquoi on a finalement choisi, pour la plupart de nos essais, les concentrations N/10 en peroxyde, M/5 en Iodure, le volume final de 20 cm³, pour un pH de 4,4 et une température de 32°. Ainsi que l'indique le tableau IV, l'addition de 1 cm³ de phosphates 2,8 M, ou de 0,15 cm³ de sulfate d'ammoniaque saturé, pratiquée fréquemment dans notre travail expérimental, ne change en rien la zone proportionnelle. La méthode est par ailleurs suffisamment sensible.

Ce travail confirme les données de M.-F. Jayle, qui l'ont amené aux conditions expérimentales de sa technique de dosage de l'haptoglobine. Ces conditions ne peuvent être modifiées sans que l'on perde en fidélité et en marge de proportionnalité, ce que l'on gagne en sensibilité. En doublant la concentration de l'iodure, nous compensons surtout ce que nous perdons en portant la dilution de 14,15 cm^3 à 20 cm^3, volume répondant mieux aux exigences de notre travail, en améliorant toutefois légèrement la sensibilité. Les bases de comparaison fournies par la troisième et la quatrième partie du tableau IV, illustrent clairement ces résultats.

DEUXIÈME PARTIE.

ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DE LA PRÉCIPITATION DE L'HAPTOGLOBINE PAR LES SELS NEUTRES.

Dans ce chapitre de notre thèse, nous avons étudié la précipitation de l'haptoglobine sérique par différents sels neutres : sulfate d'ammoniaque, sulfate de magnésie, sulfate de soude, chlorure de sodium, acétate de potassium et phosphate de potassium. La première partie de ce travail a été effectuée sur le même sérum de cheval, qui nous a été fourni par les Etablissements Roussel, auxquels nous adressons nos remerciements, et grâce à l'extrême obligeance de Monsieur Barotte. Il s'agissait d'un cheval ayant subi de nombreuses saignées, dont le sérum présentait un certain degré d'opalescence incompatible avec son utilisation thérapeutique. Son indice d'Haptoglobine était Hi = 2.

L'haptoglobine, dès qu'elle est floculée, perd une grande partie de son activité enzymatique. Nous étudierons les modalités de cette dénaturation. Disons dès maintenant qu'elle a rendu impossible une expérimentation portant sur une solution d'haptoglobine fractionnée et que tous nos essais ont dû être faits sur l'haptoglobine native du sérum. Nous n'avons donc pas établi la courbe de précipitation théorique de l'haptoglobine. D'ailleurs le but de ce travail, comme nous l'avons exposé page 63, était d'étudier l'influence d'un grand nombre de protéines sur la précipitation d'une protéine définie, pour laquelle nous possédions un test d'évaluation spécifique. Cela nous permettait également, en prenant comme ligne de démar-

cation le début de la précipitation de l'haptoglobine, de juger comparativement du pouvoir précipitant des différents sels.

PRÉCIPITATION DE L'HAPTOGLOBINE SÉRIQUE PAR DIFFÉRENTS SELS NEUTRES.

Préparation des solutions.

Nous avons préparé des solutions saturées de sulfate d'ammoniaque et d'un mélange de phosphates mono et bipotassiques, dont les molarités respectives étaient de 4,1 et 3,5 (voir page 61). Pour le sulfate de sodium nous avons utilisé la solution de Hove contenant 222 g. par litre de ce sel anhydre. Mais cette solution ne réalisant que le fractionnement des albumines et des globulines, nous avons réussi, à 37°, à porter sa concentration à 444 g. par litre, ce qui nous a permis d'étudier la courbe de précipitation de l'haptoglobine. Des solutions saturées ont été également préparées avec les trois autres sels utilisés, le sulfate de magnésie, le chlorure de sodium et l'acétate de potassium. Nous n'avons employé que des sels purifiés ou R.P.

1° Précipitation de l'haptoglobine par le sulfate d'ammoniaque et le phosphate de potassium.

Les différents essais ont été réalisés par simple mélange du sérum avec les solutions salines. La technique utilisée a été identique dans tous les cas, avec une dilution finale au 1/10°. Au préalable, nous avons recherché si le temps d'attente avant la filtration avait une influence sur la précipitation. Nous avons donc fait deux expériences à 37°, en laissant reposer les solutions respectivement 3 heures et 15 heures. Les résultats indiqués sur le tableau V montrent que le temps d'attente n'a aucune influence sur la précipitation de l'haptoglo-

TABLEAU V.

Précipitation comparée de l'Haptoglobine par SO_4 $(NH_4)_2$ et le mélange de phosphates mono et bipotassiques à différentes températures.

Molarités			1,20	1,30	1,40	1,50	1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2
Sels utilisés	Température	Contact										
Phosphates 3,5M.....	37°	3 h.	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
Phosphates 3,5M.....	37°	15 h.	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
Phosphates 3,5M	22°	5 h.	2	2	2	2	2	1,95	1,90	1,87	1,83	1,80
Phosphates 3,5M	0°	5 h.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,90
Sulfate NH_4 4,1M.....	22°	5 h.	2	2	2	2	2	2	2	2	1,88	
Sulfate NH_4 4,1M.....	0°	5 h.	2	2	2	2	2	2	2	2	1,88	

Molarités			2,05	2,17	2,20	2,25	2,35	2,45	2,55	2,65	2,70	2,75	2,80
Sels utilisés	Température	Contact											
Phosphates 3 5M	37°	3 h.		1,70	1,42	1,25	0,80	0,50	0,35	0,22	0,17	0,15	0
Phosphates 3,5M.....	37°	15 h.		1,70	1,42	1,25	0,80	0,50	0,35	0,22	0,17	0,15	0
Phosphates 3,5M.....	22°	5 h.		1,72	1,47	1,26	0,82	0,52	0,37	0,23	0,18	0,16	0
Phosphates 3,5M.....	0°	5 h.		1,79	1,57	1,30	0,85	0,56	0,40	0,25	0,20	0,18	0
Sulfate NH_4 4,1M.....	22°	5 h.	1,80	1,40	1,20	1	0,64	0,35	0,25	0			
Sulfate NH_4 4,1M.....	0°	5 h.	1,80	1,40	1,20	1	0,64	0,35	0,25	0			

(Les chiffres représentent les indices d'haptoglobine des différents filtrats rapportés à 0,05 cm³ de sérum initial).

bine. C'est pourquoi toutes les expériences suivantes ont été réalisées après 5 heures d'attente seulement.

Si l'on considère les indices d'haptoglobine mesurés sur les filtrats et rapportés à une même quantité de sérum initial, on constate que la précipitation de l'haptoglobine par les phosphates s'étale entre les molarités 1,4 et 2,8. Cependant l'étalement est apparemment plus important à 22° et à 37° qu'à 0°. On serait tenté d'interpréter ces résultats, en admettant que l'augmentation de la température de 0° à 37° fait légèrement dévier la précipitation vers les faibles molarités. En fait, ce n'est là qu'une apparence, car si nous portons en abscisse les molarités salines et en ordonnée le logarithme des indices d'haptoglobine (fig. 12), nous obtenons, aussi bien à 0° qu'à 22° et à 37°, deux segments de droite, le premier à pente très douce se raccordant au second à la molarité 2,17. On peut déduire de l'étude de ces courbes que la précipitation réelle de l'haptoglobine par les phosphates se produit entre les molarités 2,17 et 2,8 et est indépendante de la

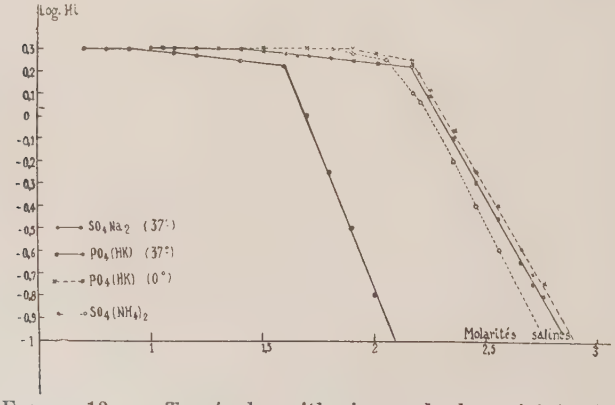

FIGURE 12. — Tracés logarithmiques de la précipitation de l'haptoglobine par différents sels et à différentes températures. Ordonnée : Log. des Hi filtrats. Abscisse : Molarités salines).

température. Le début de la précipitation entre 1,4 et 2,17 ne représente que l'entraînement de l'haptoglobine par les globulines et augmente avec la température.

Nous avons fait les mêmes essais avec le sulfate d'ammoniaque. Ici, les courbes obtenues à 0° et à 37° sont rigoureusement superposables (fig. 12). Si nous ne tenons pas compte de l'entraînement par les globulines, qui commence à la molarité 1,8 on constate que la précipitation de l'haptoglobine se produit entre les molarités 2,05 et 2,65. La pente du tracé n'est pas influencée ici non plus par la température.

L'haptoglobine du sérum de cheval est donc légèrement entraînée par les globulines, mais précipite avec les albumines.

Nos résultats confirment ceux de Y. Derrien, qui estime que le pouvoir de précipitation du mélange de phosphates mono et bipotassiques est identique à celui du sulfate d'ammoniaque, quand on ajoute 0,12 à la molarité de ce dernier. En d'autres termes, la séparation des albumines et des globulines est réalisée par le sulfate d'ammoniaque à la molarité 2,05 et par le mélange de phosphates à celle de 2,17. Il est intéressant de constater qu'en utilisant des tests totalement différents, nous retrouvons que la molarité 2,05 en sulfate d'ammoniaque correspond bien à la molarité 2,17 en phosphate de potassium.

2° Précipitation de l'haptoglobine par les sulfates d'ammoniaque, de magnésie et de sodium.

Dans ces essais, toutes les conditions expérimentales ont été identiques, à l'exception de la température qui, dans le cas de SO_4Na_2 a dû être portée à 37°. On voit sur le tableau VI, qu'à molarité égale, le pouvoir précipitant du sulfate de magnésie est rigoureusement comparable à celui du sulfate d'ammoniaque, fait qui confirme le travail de Derrien. A la molarité 2,05, qui représente la saturation en SO_4 Mg et la demi-saturation en SO_4 $(NH_4)_2$, la même quantité d'haptoglobine est précipitée.

Dans nos essais avec le sulfate de sodium, nous avons, en une première série d'expériences, opéré conformément

TABLEAU VI.

Précipitation de l'Haptoglobine par les sulfates de NH_4, Mg, et Na.

Molarités	0,70	0,80	0,90	1,1	1,20	1,30	1,45	1,60	1,70	1,80	1,90	2	2,05	2,20	2,45	2,65
Sulfate NH_4 4,1M 22°.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,88	1,85	1,80	1,20	0,35	0
Sulfate Mg 2,05M 22°.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,88	1,85	1,80			
Sulfate Na 1,56M 37°.	2	2	2	1,93	1,90	1,88	1,80									
Sulfate Na 3,12M 37°.	2	2	2	1,93	1,90	1,88	1,80	1,70	1	0,56	0,32	0,15	0			

aux indications de la technique de Hove, en utilisant une solution contenant, à 37°, 222 g. de SO_4 Na_2 pur et anhydre (Molarité 1,56). Dans ces conditions, si l'on ajoute à 1 cm³ de sérum, 9 cm³ de cette solution à 37°, on réalise, selon Hove, la séparation des globulines et des albumines. A cette concentration, qui, sur le tableau VI, correspond à la molarité 1,45, on retrouve dans le filtrat un indice d'haptoglobine de 1,8, c'est-à-dire précisément le même que dans le cas de SO_4 $(NH_4)_2$ et SO_4 Mg à 2,05 M. Conformément à l'attente, le sulfate de sodium, à molarité égale, a un pouvoir précipitant nettement supérieur à celui des autres sels utilisés.

En utilisant, toujours à 37°, une solution contenant 444 g. de SO_4 Na_2 par litre (Molarité 3,12), nous avons réussi à floculer la totalité des protéines du sérum. Les résultats sont mentionnés sur le tableau VI, ainsi que sur la figure 12. La précipitation de l'haptoglobine commence à la molarité 0,90 et se termine à 2,05. Le tracé logarithmique indique clairement que la ligne de démarcation entre l'entraînement et la précipitation proprement dite, se situe à 1,6 M. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Hove, d'après lesquels ce serait la molarité 1,45 qui correspondrait à la molarité 2,05 en SO_4 $(NH_4)_2$.

Si nous calculons les pentes des tracés logarithmiques de précipitation de l'haptoglobine du sérum chevalin utilisé (figure 12) par le phosphate de potassium, le sulfate d'ammoniaque et le sulfate de sodium, nous constatons qu'elles sont différentes. Elles sont respectivement de 1,85 avec les phosphates, 1,7 avec SO_4 $(NH_4)_2$ et 2,4 avec SO_4 Na_2. C'est avec ce dernier sel, que le segment de précipitation de l'haptoglobine est le plus raccourci.

3° Précipitation de l'haptoglobine par le chlorure de sodium et l'acétate de potassium.

L'essai avec le chlorure de sodium a été négatif. Le ClNa, comme on pouvait s'y attendre, ne possède vis-à-

vis de l'haptoglobine, aucun pouvoir précipitant (tableau VII). Nous avons dosé, par la méthode de Mohr, la concentration saline de notre solution saturée et nous l'avons trouvée égale à 322 g. pour mille, ce qui correspond à une molarité de 5,5. On peut en déduire que le pouvoir précipitant du sulfate de sodium est davantage lié à l'anion qu'au cathion, puisque ce sel, à concentration sodique égale, précipite la quasi-totalité des protéines.

TABLEAU VII.

Précipitation de l'Haptoglobine par le chlorure de Sodium et l'Acétate de Potassium.

Molarités	1	1,5	1,8	2	2,1	2,5	2,8	3	4	5	5,5
ClNa saturé 5,5M....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Acétate de K saturé 3M.....	2	2	2	1,86	1,80	1,60	1,40	1,30			

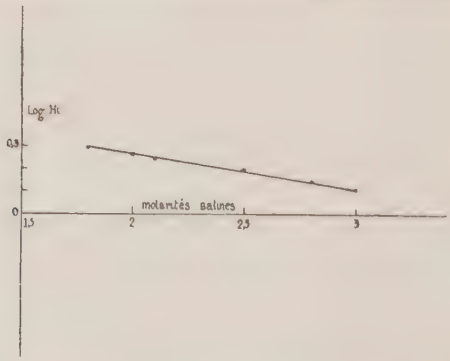

Figure 13. — Précipitation de l'haptoglobine par l'acétate de potassium.

Avec l'acétate de potassium (tableau VII), la précipitation de l'haptoglobine commence à 1,8 M et se poursuit en pente très douce jusqu'à la molarité 3, qu'on ne peut dépasser dans nos conditions expérimentales. L'indice

passe de 2 à 1,3, mais on a plutôt l'impression qu'il s'agit beaucoup plus d'un entraînement que d'une précipitation vraie (fig. 13).

4° Dénaturation de l'haptoglobine par les sels neutres.

Quand on floculе l'haptoglobine par un sel neutre, il se produit le plus souvent une dénaturation notable que l'on mesure par la diminution de l'activité haptoglobinique de la solution précipitée, en rapportant cette dernière au sérum initial et en lui ajoutant l'indice d'haptoglobine du filtrat correspondant.

a) Floculation de l'haptoglobine par le mélange « phosphates ».

Nous avons opéré ce fractionnement à 22° et à 0°. Nous sommes parti de 1 cm³ de sérum, auquel nous avons ajouté 9 cm³ de la solution saline à concentration calculée. La filtration a été effectuée après 5 heures d'agi-

TABLEAU VIII.

Etude de la dénaturation de l'Haptoglobine par le Sulfate d'NH₄.

Température	Molarité saline	Hi sérum	Hi filtrat	Hi précipité	$\frac{1}{2}$ (HiF + HiP)	Hi F + P	p. 100 dénaturation
22°	2,2	2	1,47	0,53	2	2	0
22°	2,4	2	0,52	1,48	2	2	0
22°	2,6	2	0,23	1,77	2	2	0
22°	2,8	2	0	1,60	1,60	1,70	15
0°	2,2	2	1,57	0,43	2	2	0
0°	2,4	2	0,56	1,44	2	2	0
0°	2,6	2	0,25	1,75	2	2	0
0°	2,8	2	0	1,70	1,70	1,80	10

(Les calculs sont effectués en indices d'Haptoglobine et rapportés au sérum initial).

tation douce et le précipité a été immédiatement repris dans 2 cm³ d'eau. On a mesuré les indices d'haptoglobine du sérum initial, des filtrats et des précipités redissous. En outre, nous avons mélangé les filtrats aux précipités redissous, de façon à reconstituer une solution correspondante du sérum initial dilué et l'indice de ce mélange a été également mesuré. Tous les résultats sont consignés dans le tableau VIII, qui rend compte du pouvoir dénaturant très faible du mélange phosphates.

En effet, la dénaturation est nulle au-dessous de la molarité 2,6. Elle n'est appréciable que lorsque cette dernière atteint 2,8, étant alors de 15 p. 100 à 22° et de 10 p. 100 à 0°. On peut conclure de ces expériences, que le phosphate de potassium à pH 6,9, a un pouvoir dénaturant très faible sur l'activité de l'haptoglobine, mais surtout que la dénaturation est fonction de la concentration du sel.

b) Floculation de l'haptoglobine par le sulfate d'ammoniaque.

Les résultats des expériences précédentes sont confirmés par la floculation de l'haptoglobine effectuée par le sulfate d'ammoniaque (tableau IX). A la molarité 2, la dénaturation est pratiquement nulle, mais elle augmente rapidement entre les molarités 2 et 2,6, atteignant alors, à 22°, 38 p. 100. Le tableau montre que la dénaturation n'est que légèrement diminuée à 0° par rapport à 22°. Notons, en outre, que l'indice Hi du mélange filtrat (F) + précipité (P) est légèrement supérieur à la somme des indices séparés et additionnés du filtrat et du précipité. Les différences sont néanmoins trop faibles pour qu'on puisse en tirer un argument en faveur d'un clivage de l'haptoglobine et, par voie de réciprocité, d'une reconstitution de cette dernière par mélange des deux fractions séparées. Il s'agit donc bien d'une simple dénaturation saline.

TABLEAU IX.

Etude de la dénaturation de l'Haptoglobine par le Sulfate d'NH_4.

Température	Molarité saline	Hi sérum	Hi filtrat	Hi précipité	Σ HiF + HiP	Hi F + P	p. 100 dénaturation
22°	2	2	1,80	0,10	1,90	1,95	2,5
22°	2,2	2	1,20	0,54	1,74	1,79	10
22°	2,4	2	0,35	0,98	1,33	1,44	28
22°	2,6	2	0	1	1	1,23	38
0°	2	2	1,80	0,10	1,90	1,95	2,5
0°	2,2	2	1,20	0,65	1,85	1,92	4
0°	2,4	2	0,35	1,09	1,44	1,53	23
0°	2,6	2	0	1,10	1,10	1,35	32

Nous pouvons conclure de ces expériences, que la dénaturation de l'haptoglobine est beaucoup plus élevée avec le sulfate d'ammoniaque qu'avec le phosphate de potassium, mais que, dans les deux cas, elle est une fonction de la concentration saline, n'apparaissant qu'aux fortes concentrations et que la température a un effet presque négligeable.

5° Influence du pH sur la précipitation de l'haptoglobine.

Nous avons recherché l'influence du pH sur la précipitation de l'haptoglobine par les phosphates. A cet effet, nous avons mélangé les solutions de phosphates mono et bipotassiques, de façon à obtenir des solutions de phosphates 3,5 M pour lesquelles les rapports $\frac{PO_4\ KH_2}{PO_4\ K_2H}$ étaient respectivement $\frac{9}{1}$, $\frac{1}{1}$ et $\frac{1}{9}$ correspondant aux pH 6,05, 6,9 et 7,9, mesurés à l'électrode de verre. Tous les essais ont été effectués à la dilution de 1/10e, à une température de 18°. Pour la détermination de l'haptoglobine dans les différents filtrats, nous avons dû rectifier

TABLEAU X.

Précipitation de l'Haptoglobine dans le sérum de cheval en fonction du pH.

Concentration en phosphates (Molarités)	1,20	1,30	1,40	1,50	1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2
pH = 6,05	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
pH = 6,9	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
pH = 7,9	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75

Concentration en phosphates (Molarités)	2,1	2,17	2,20	2,25	2,35	2,45	2,55	2,65	2,70	2,75	2,80
pH = 6,05	1,72	1,30	1,20	0,95	0,63	0,40	0,28	0	0	0	0
pH = 6,9	1,72	1,70	1,42	1,25	0,80	0,50	0,35	0,22	0,17	0,15	0
pH = 7,9	1,72	1,70	1,70	1,40	0,89	0,57	0,40	0,26	0,20	0,17	0

le pH et la concentration saline, par addition à la solution tampon de quantités calculées d'acide phosphorique et de phosphate, de façon à opérer la mesure dans des conditions rigoureusement comparables. Les résultats sont portés sur le tableau X et sur la figure 14. On constate que l'influence du pH sur la précipitation de l'haptoglobine est relativement faible. A pH 6,9, la précipitation effective a lieu entre les molarités 2,17 et 2,8, ainsi que nous l'avons vu dans un chapitre précédent. A pH 6,05, elle a lieu entre les molarités 2,1 et 2,65 ; à pH 7,9, de 2,2 à 2,8. On peut dire que la déviation de la zone de précipitation par les solutions acide ou alcaline, par rapport à celle de la solution équimoléculaire, se fait dans le même sens que les pH, mais que le décalage, au début comme à la fin de la précipitation, est inférieur à 0,15.

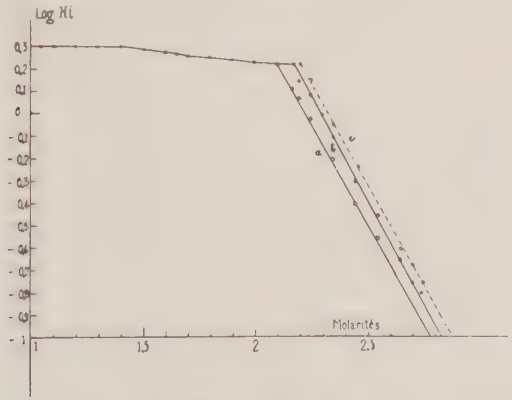

FIGURE 14. — Influence du pH sur la précipitation de l'haptoglobine par les phosphates.
Tracé a : pH 6,05
Tracé b : pH 6,9
Tracé c : pH 7,9.

La figure 14 indique que la pente des trois segments de droite, aux 3 pH indiqués, est identique et égale à 1,85. Cela vérifie donc la loi de COHN, selon laquelle le pH et la température n'ont aucune influence sur la constante de précipitation K's, mais ne modifient que la constante de solubilité β.

6° Influence du mode d'introduction de la solution saline sur la précipitation de l'haptoglobine.

Abdellatif avait déjà remarqué [20] que la zone de précipitation de l'haptoglobine était influencée par le mode d'introduction de la solution saline dans le sérum dilué. Nous avons repris d'une façon systématique ces essais, avec les solutions de phosphates mono et bipotassiques et de sulfate d'ammoniaque. Dans nos premières expériences, nous avons opéré avec un dispositif très simple, en introduisant la solution saline saturée dans une ampoule à brome à extrémité effilée et en la faisant tomber goutte à goutte, à la cadence d'une goutte toutes les 5 secondes, le long des parois du flacon contenant le sérum de cheval dilué, que l'on agitait continuellement. Comparativement, dans un autre essai, la solution saline diluée était ajoutée sans précautions au sérum pur, de façon à obtenir un volume final et une molarité identiques. On laissait reposer la solution pendant 5 heures avant la filtration.

Les résultats apparaissent aussi bien sur le tableau XI que sur la figure 15 et indiquent clairement, dans le cas de précipitation par la solution de phosphates :

1°) que l'entraînement de l'haptoglobine de cheval par les globulines est presque totalement évité, quand on opère l'introduction lente, alors qu'il commence à la molarité 1,5 quand on ne prend pas de précautions.

2°) Que la zone de précipitation réelle de l'haptoglobine de cheval est décalée environ d'un dixième de molarité vers les fortes molarités dans l'opération progressive (tracé n° 1). La précipitation vraie se situe entre 2,25 M et 2,8 M avec la méthode de diffusion alors qu'elle est comprise entre 2,17 M et 2,8 M avec la méthode habituelle (tracé n° 2).

Les pentes des deux tracés sont respectivement égales à 2,2, pour la méthode de diffusion, et à 1,85, pour la méthode habituelle.

TABLEAU XI.

Précipitation de l'Haptoglobine par le mélange de phosphates mono et bipotassiques.

Molarités	1,20	1,30	1,40	1,50	1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2
Mélange sans précautions ..	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
Diffusion saline.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Molarités	**2,17**	**2,20**	**2,25**	**2,35**	**2,45**	**2,55**	**2,65**	**2,70**	**2,75**	**2,80**
Mélange sans précautions ..	1,70	1,42	1,25	0,80	0,50	0,35	0,22	0,17	0,15	0
Diffusion saline.....	1,90	1,8	1,78	1,26	0,75	0,46	0,30	0,26	0,20	0

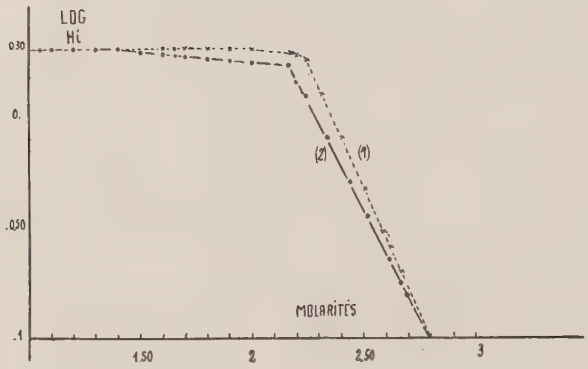

FIGURE 15. — Précipitation de l'haptoglobine par les phosphates en fonction du mode d'introduction de la solution saline.

Nous avons répété ces mêmes fractionnements comparés sur trois sérums de cheval S1, S2 et S3, avec la salution saturée de SO_4 $(NH_4)_2$.

Les résultats sont mentionnés sur le tableau XII. La dilution au 1/10e était obtenue à la demi-saturation, soit à la molarité 2,05. Les résultats sont encore plus schématiques avec ces expériences qu'avec les précédentes. Comme on le voit sur la figure 16, qui montre les tracés obtenus avec le sérum S1, lorsqu'on ajoute la solution

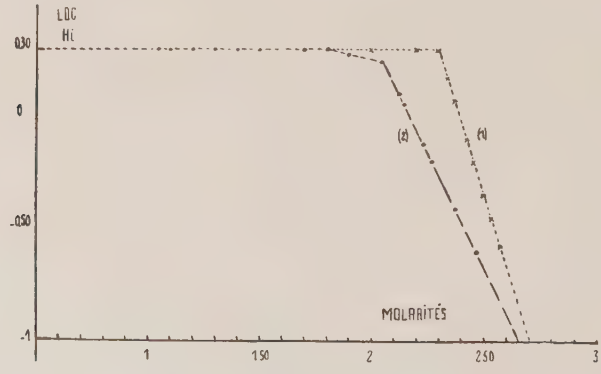

FIGURE 16. — Précipitation de l'haptoglobine par le sulfate d'ammoniaque en fonction du mode d'introduction de la solution saline.

TABLEAU XII.

Précipitation de l'Haptoglobine dans 3 sérums de cheval par la solution de SO_4 $(NH_4)_2$ saturée (méthode habituelle et méthode de diffusion).

Indices de saturation		0,40	0,41	0,42	0,45	0,47	0,50	0,53	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,62	0,65	0,67
Molarités		1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2,05	2,17	2,20	2,25	2,30	2,35	2,45	2,55	2,65	2,70
S 1	Méthode habituelle...	2	2	2	2	1,88	1,80	1,40	1,20	1	0,75	0,64	0,35	0,25	0	0
	Méthode de diffusion.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,52	0,79	0,46	0,27	0
S 2	Méthode habituelle...	1,80	1,80	1,80	1,80	1,69	1,60	1,22	1	0,78	0,65	0,42	0,25	0,15	0	0
	Méthode de diffusion.	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,34	0,58	0,31	0,15	0
S 3	Méthode habituelle...	1,50	1,50	1,50	1,50	1,38	1,29	1	0,90	0,67	0,57	0,42	0,21	0,12	0	0
	Méthode de diffusion.	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,10	0,48	0,24	0,15	0

saturée progressivement, l'haptoglobine précipite entre les indices de saturation 0,57 et 0,67, ce qui correspond aux molarités 2,3 et 2,7 (tracé n° 1).

Par contre, si le mélange est fait sans précautions, la zone de précipitation se situe entre les indices 0,50 et 0,65, c'est-à-dire entre les molarités 2,05 et 2,65 (tracé n° 2). Le mode d'introduction de la solution saline a donc ici un double effet sur la précipitation de l'haptoglobine. Quand la solution est introduite progressivement, la zone de précipitation est très sensiblement réduite. Ceci est en faveur de la technique de diffusion saline, dont le mode opératoire idéal est réalisé par la membrane de collodion rotative de Cohn et Mac Meekin. D'autre part, dans la technique progressive, la zone de précipitation réelle est déplacée vers les fortes molarités.

Les pentes des tracés logarithmiques sont différentes pour les deux méthodes. Elles sont ici, dans l'expérimentation sur le sérum S1, de 1,7 pour la méthode classique (tracé n° 2) et de 2,5 pour la méthode de diffusion (tracé n° 1).

Ce qui frappe également dans ces expériences, c'est la constance des limites de précipitation de l'haptoglobine chez une espèce animale donnée et la superposition parfaite des résultats obtenus par les deux techniques utilisées pour les différents sérums de cheval étudiés.

Abd'ellatif, opérant dans son fractionneur sur deux des trois sérums que nous avons utilisés, a obtenu les mêmes résultats que nous, précipitant la majeure partie de l'haptoglobine entre les indices 0,60 et 0,65. Il ne cherchait pas à déterminer quantitativement la zone de précipitation, mais seulement à isoler l'haptoglobine dans une fraction aussi rétrécie que possible. Nous avons utilisé dans d'autres expériences un fractionneur identique au sien (voir le schéma que nous en avons donné plus haut), ce qui simplifie nettement l'opération, sans pour cela la rendre plus rigoureuse.

7° Influence de la dilution sur la précipitation de l'haptoglobine.

a) Précipitation par les phosphates.

Méthode de diffusion. — Les conditions expérimentales ont été fixées afin d'obtenir, pour la molarité 2, les dilutions au 1/4, au 1/8e et au 1/10e. La solution saline a été introduite dans le sérum préalablement dilué, selon la modalité dite de diffusion, à la cadence d'une goutte toutes les 5 secondes. Par cette technique, lorsqu'on passe de la dilution au 1/4 à la dilution au 1/10e, on observe un très léger décalage vers les fortes molarités, mais l'étendue de la zone de précipitation proprement dite n'est pas modifiée (tableau XIII).

Méthode habituelle. — Les opérations suivantes ont été faites à volume constant, en introduisant dans un Erlenmeyer, 1cm³ de sérum et X cm³ de la solution de phosphates à molarités calculées de façon à réaliser, pour une même dilution, toute la gamme de concentrations indiquée sur le tableau XIII. La filtration était effectuée après 5 heures de repos. Les différents taux de dilution étudiés furent les suivants : 1/5, 1/10, 1/20 et 1/30.

L'examen du tableau montre que l'entraînement de l'haptoglobine par les globulines est important pour la dilution au 1/5, encore appréciable au 1/10, mais qu'il est totalement supprimé pour les dilutions au 1/20 et 1/30. Quant à l'étendue de la zone de précipitation réelle de l'haptoglobine, elle est rigoureusement superposable dans tous les cas et comprise entre 2,17 et 2,8 M.

b) Précipitation par le sulfate d'ammoniaque.

Méthode de diffusion. — Les additions de la solution saturée de $SO_4(NH_4)_2$ sont calculées de façon à obtenir, à la demi-saturation, les dilutions 1/2, 1/4, 1/7 et 1/10. Par cette technique, les dilutions sont évidemment variables selon les molarités, puisqu'on opère par addition

TABLEAU XIII.

Précipitation de l'Haptoglobine par le mélange de phosphates mono et bipotassiques à différentes dilutions du sérum.

	Molarités	1,20	1,30	1,40	1,50	1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2
Technique de diffusion	Dilution au 1/4.....	2	2	2	2	2	2	2	2	1,90	1,85
	Dilution au 1/8.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,90
	Dilution au 1/10.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Technique habituelle	Dilution au 1/5.....	2	2	1,96	1,80	1,77	1,74	1,70	1,68	1,66	1,65
	Dilution au 1/10.....	2	2	2	1,95	1,90	1,88	1,86	1,81	1,77	1,75
	Dilution au 1/20.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Dilution au 1/30.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Molarités	2,17	2,20	2,25	2,35	2,45	2,55	2,65	2,70	2,75	2,80
Technique de diffusion	Dilution au 1/4.....	1,81	1,79	1,75	1,25	0,77	0,44	0,30	0,25	0,20	0
	Dilution au 1/8.....	1,85	1,82	1,75	1,25	0,75	0,45	0,29	0,25	0,20	0
	Dilution au 1/10.....	1,90	1,87	1,78	1,26	0,75	0,46	0,30	0,26	0,20	0
Technique habituelle	Dilution au 1/5.....	1,60	1,38	1,20	0,75	0,45	0,32	0,20	0,16	0,14	0
	Dilution au 1/10.....	1,70	1,42	1,25	0,80	0,50	0,35	0,22	0,17	0,15	0
	Dilution au 1/20.....	1,90	1,85	1,77	1,30	0,75	0,45	0,25	0,20	0,15	0
	Dilution au 1/30.....	1,90	1,85	1,77	1,30	0,75	0,45	0,25	0,20	0,15	0

progressive de la solution saturée. On constate sur le tableau XIV, que pour la dilution au 1/2, l'entraînement est très important entre les indices de saturation 0,47 et 0,57. Il est encore notable au 1/4 et pratiquement nul à partir du 1/7. Par contre, la zone de précipitation proprement dite, c'est-à-dire le second segment du tracé logarithmique, n'est que peu influencée par la dilution et se situe entre les molarités 2,3 et 2,7, ou, en indices de saturation, entre Is = 0,57 et Is = 0,67.

Méthode habituelle. — Ici, la solution saturée est ajoutée sans précautions, mais volume et dilution sont constants pour toutes les molarités. Nous avons opéré successivement aux dilutions 1/5, 1/10, 1/20 et 1/30, avec une technique analogue à celle qui est décrite à propos de la précipitation par les phosphates. Les résultats sont indiqués sur le tableau XIV. Pour la dilution au 1/5, il est difficile de dissocier ce qui revient à l'entraînement et à la précipitation réelle : l'haptoglobine commence à précipiter à la molarité 1,7 et on n'en retrouve pratiquement plus à la molarité 2,55. La zone de précipitation est donc très étalée et confuse. Pour la dilution au 1/10, il est possible de dissocier les deux phénomènes : l'entraînement par les globulines se situe entre 1,8 M et 2,05 M et la précipitation proprement dite entre 2,05 M et 2,65 M. Aux dilutions 1/20 et 1/30, les résultats sont pratiquement superposables. L'entraînement par les globulines est alors complètement éliminé et l'haptoglobine précipite entre les molarités 2,05 et 2,65, correspondant aux Is 0,5 et 0,65.

En somme, la dilution n'influence pas la zone de précipitation logarithmique de l'haptoglobine, qui est seulement apparamment faussée par un entraînement mutuel des protéines. Cet entraînement est encore notable pour la dilution au 1/10 et n'est totalement supprimé qu'à la dilution de 1/20.

Mettons maintenant en parallèle les résultats obtenus avec le sulfate d'ammoniaque, par les deux techniques

TABLEAU XIV.

Précipitation de l'Haptoglobine par la solution saturée de SO_4 $(NH_4)_2$ à différentes dilutions du sérum.

	Indices de saturation	0,40	0,41	0,42	0,45	0,47	0,50	0,53	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,62	0,63	0,67
	Molarités	1,60	1,65	1,70	1,80	1,90	2,05	2,17	2,20	2,25	2,30	2,35	2,45	2,55	2,65	2,70
Technique de diffusion	Dilution au 1/2.....	2	2	2	2	2	1,84	1,72	1,65	1,45	1,30	1,20	0,69	0,52	0,25	0
	Dilution au 1/4.....	2	2	2	2	2	2	2	1,70	1,58	1,43	1,32	0,70	0,50	0,25	0
	Dilution au 1/7.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,90	1,52	0,80	0,45	0,27	0
	Dilution au 1/10.....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,52	0,79	0,46	0,27	0
Technique habituelle	Dilution au 1/5.....	2	2	1,90	1,85	1,80	1,75	1,50	1,25	0,90	0,70	0,65	0,30	0,10	0	0
	Dilution au 1/10.....	2	2	2	2	1,88	1,80	1,40	1,20	1	0,75	0,64	0,35	0,25	0	0
	Dilution au 1/20.....	2	2	2	2	2	2	1,60	1,30	1,10	0,80	0,60	0,35	0,25	0	0
	Dilution au 1/30.....	2	2	2	2	2	2	1,65	1,35	1,10	0,80	0,60	0,35	0,25	0	0

utilisées, la technique habituelle et celle de diffusion. Prenons, par exemple, le fractionnement du sérum de cheval par addition progressive de la solution de $SO_4 (NH_4)_2$, à la dilution au 1/10. En fait, il est arbitraire de parler d'une dilution au 1/10, puisque celle-ci n'est réalisée qu'à la demi-saturation et qu'en réalité, par cette technique, la dilution varie de 1/10 à la demi-saturation (Is = 0,5) à 1/20 à la fin de l'opération (Is = 0,67). Dans ces conditions, la zone de précipitation de l'haptoglobine est nettement plus resserrée (entre Is = 0,57 et Is = 0,67) que dans la seconde méthode, où la zone s'étend de Is = 0,50 à Is = 0,65. Il ne s'agit pas d'un équilibre qui n'aurait pas été atteint dans l'un ou l'autre cas, puisque nous avons laissé reposer les solutions le même temps avant la filtration. Le facteur dilution ne pouvant être mis en cause, la seule variable est donc le mode d'introduction de la solution saline, qui modifie profondément la courbe de précipitation d'une protéine homogène, quand celle-ci est mélangée à d'autres protéines. Dans tous les cas cependant, la courbe de précipitation est logarithmique.

8° Précipitation comparée de l'haptoglobine, de l'hémoglobine et du complexe « hémoglobine-haptoglobine ».

Nous avons utilisé dans cette expérience, un sérum pathologique de cheval (Hi = 2) et nous l'avons fractionné en ajoutant à 2 cm³ de sérum dilué au 1/2, 9 cm³ d'une solution de sulfate d'ammoniaque, dont les différentes concentrations étaient calculées de façon à réaliser des indices de saturation progressivement croissants de 0,4 à 0,775. La même opération a été réalisée sur le sérum additionné de 8 cm³ d'hémoglobine M/500 pour 50 cm³ de sérum et 42 cm³ d'eau. Ici, la totalité de l'haptoglobine s'est complexée avec l'hémoglobine ajoutée en excès. Enfin, dans un troisième temps, la zone de préci-

pitation de l'hémoglobine a été délimitée, en mesurant à l'électrophotomètre de Meunier les coefficients d'extinction des différents filtrats obtenus par fractionnement d'une solution d'hémoglobine purifiée M/6.250.

Le tableau XV relate les indices d'haptoglobine des filtrats des deux premières expériences, avec et sans hémoglobine et les mesures électrophotométriques pour la solution d'hémoglobine.

TABLEAU XV.

Précipitation par le sulfate d'ammoniaque de l'Haptoglobine, de l'Hémoglobine et du complexe Haptoglobine-Hémoglobine.

Molarités	Indice de saturation des filtrats	Hi sérum	I_o hémoglobine	Hi sérum + hémoglobine
1,60	0,4	2	42	2
1,70	0,425	2	42	2
1,80	0,45	2	42	2
1,90	0,475	2	42	2
2,05	0,50	1,80	42	2
2,25	0,55	1	42	2
2,45	0,60	0,35	42	1,95
2,55	0,625	0,25	42	1,95
2,65	0,65	0	42	0,97
2,70	0,675		42	
2,85	0,70		28	0,35
2,95	0,725		18	
3	0,750		13	0,20
3,15	0,775		0	0

On remarque que par cette technique de précipitation où les solutions ont été mélangées sans précautions, la zone de floculation de l'haptoglobine s'étale entre les indices de saturation 0,5 et 0,65 ; celle de l'hémoglobine est comprise entre 0,675 et 0,775 ; quant à celle du complexe Hb-Hp, elle est intermédiaire aux deux précédentes et se situe entre 0,6 et 0,775. La figure 17 donne les tracés logarithmiques du fractionnement de l'haptoglobine (a), de l'hémoglobine (c) et du complexe « hémo-

globine-haptoglobine » (b). On voit que, lorsque l'haptoglobine est combinée à l'hémoglobine, le début de sa précipitation réelle est déplacé vers les fortes molarités salines et que la fin de sa précipitation coïncide avec celle de l'hémoglobine purifiée. Quant à la pente du tracé « Hb-Hp », elle est de 1,7, soit rigoureusement identique à celle du tracé Hp. La pente du tracé Hb leur est supérieure et égale à 2,8. Quelles sont les raisons pour lesquelles la combinaison « Hb-Hp » flocule dans une zone intermédiaire aux précipitations de l'hémoglobine et de

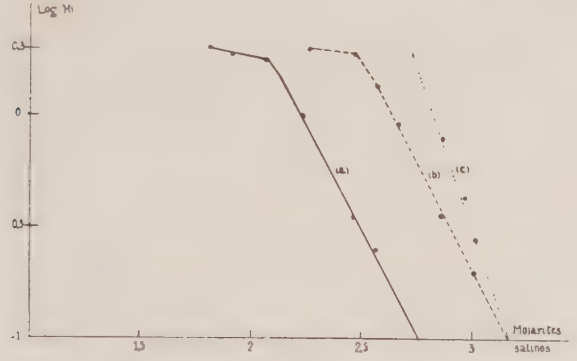

FIGURE 17. — Précipitation par $SO_4 (NH_4)_2$ de l'haptoglobine (a) de l'hémoglobine (c) et du complexe Hb-Hp (b).

l'haptoglobine ? On peut en donner l'explication suivante. Une molécule d'hémoglobine ne se fusionne pas avec une molécule d'haptoglobine pour donner naissance à un complexe, dont le poids moléculaire serait la somme des poids moléculaires respectifs de l'hémoglobine et de l'haptoglobine, mais les deux molécules s'associent, tout en conservant relativement leur individualité physico-chimique. L'hémoglobine, en s'accrochant sur l'haptoglobine, accroît sa solubilité, ce qui se traduit par un déplacement vers la droite du début de sa précipitation. Mais il est remarquable de constater que, seule, la solubilité de l'haptoglobine est modifiée. Ses propriétés physico-chimiques fondamentales sont restées les mêmes, puis-

que la pente du tracé est demeurée identique. Si l'on voulait reporter ces données sur l'équation de Cohn, on pourrait dire qu'en s'associant à l'haptoglobine, l'hémoglobine a augmenté sa constante β, sans modifier la constante K's.

TABLEAU XVI.

Précipitation de l'Haptoglobine du sérum humain en absence et en présence d'Hémoglobine.

Indices de saturation	Indices d'haptoglobine des sérums et des filtrats					
	SI	SI+Hb	SII	SII+Hb	SIII	SIII+Hb
0	2,90		1,28		1,90	
0,5	0,10	2,90	0,32	1,30	0,25	1,90
0,55	0	2	0	1,02	0	1,62
0,60		0,57		0,50		0,50
0.65		0,25		0,17		0,25
0,70		0		0		0

Le déplacement sur l'abscisse est encore plus frappant dans nos expériences avec des sérums humains. Ici, comme l'indique le tableau XVI, la presque totalité de l'haptoglobine précipite normalement avec les globulines, mais il suffit d'y ajouter un excès d'hémoglobine, pour la retrouver entièrement dans la fraction albuminique, qui précipite entre les indices de saturation 0,5 et 0,70. En somme, l'hémoglobine, en se fixant sur l'haptoglobine humaine, a transformé une globuline en une albumine. Ce résultat est d'autant plus surprenant, qu'on se serait attendu à l'inverse : il est en effet paradoxal de constater que l'accroissement du volume d'un complexe protéidique, puisse diminuer sa floculabilité. Ces faits nous rendent sceptiques sur la valeur réelle du fractionnement du sérum en sérine et globuline.

9° Précipitation de l'haptoglobine de sérums humains par le sulfate d'ammoniaque.

Nous avons traité, en totalité, douze sérums humains par la technique à volume constant et à une dilution égale à 1/5. Pour chaque sérum, nous avons effectué deux séries de fractionnements, en modifiant seulement le mode d'introduction de la solution saline saturée, toutes les conditions expérimentales étant maintenues constantes par ailleurs. Dans une série, les solutions étaient mélangées sans précautions ; dans l'autre, la solution saturée était introduite par diffusion. Les résultats sont consignés sur le tableau XVII. On constate, au premier examen, qu'il existe deux types différents d'haptoglobine humaine. Le premier précipite avec la dernière fraction des globulines, le second dans la fraction initiale des albumines. Le type globulinique est de beaucoup le plus fréquent, puisque nous l'avons rencontré dix fois sur douze sérums étudiés. Dans la méthode classique habituelle (méthode H), les zones de précipitation se situent respectivement entre les indices de saturation 0,4 et 0,5 pour l'haptoglobine du type globulinique et entre 0,5 et 0,6 pour l'haptoglobine du type albuminique. Pour les dix premiers sérums, dont les indices d'haptoglobine varient de 1 à 5, les zones de précipitation sont à ce point superposables, qu'on retrouve toujours pour Is = 0,45, 60 p. 100 de l'haptoglobine présente éliminée, quelle que soit la concentration initiale du sérum en ce protéide.

Mais si nous introduisons la solution saline à l'aide du fractionneur (méthode D), nous assistons à un rétrécissement de la zone de floculation entre les indices de saturation 0,45 et 0,5 pour l'haptoglobine du type globulinique et entre 0,525 et 0,6 pour le type albuminique.

Le mode d'introduction de la solution saline a donc, comme dans le cas du sérum de cheval, une influence primordiale sur la zone de précipitation de l'haptoglobine à partir du sérum total.

TABLEAU XVII.

Précipitation de l'Haptoglobine dans 12 sérums humains (par SO_4 $(NH_4)_2$).

Indices de saturation		0	0,4	0,425	0,45	0,475	0,5	0,525	0,55	0,575	0,6
S 1	Méthode H.....	4,95	4,95	3,21	1,95	1,20	0				
	Méthode D	4,95	4,95	4,95	4,95	2,50	0				
S 2	Méthode H.....	1,85	1,85	1,15	0,72	0,45	0				
	Méthode D.....	1,85	1,85	1,85	1,85	0,90	0				
S 3	Méthode H.....	1,62	1,62	1,10	0,70	0,40	0				
	Méthode D.....	1,62	1,62	1,62	1,62	0,78	0				
S 4	Méthode H	1,42	1,42	0,95	0,60	0,35	0				
	Méthode D.....	1,42	1,42	1,42	1,42	0,67	0				
S 5	Méthode H.....	1,27	1,27	0,81	0,50	0,30	0				
	Méthode D.....	1,27	1,27	1,27	1,27	0,60	0				
S 6	Méthode H.....	1,75	1,75	1,20	0,72	0,42	0				
	Méthode D	1,75	1,75	1,75	1,75	0,90	0				
S 7	Méthode H.....	4	4	2,65	1,70	1,05	0				
	Méthode D.....	4	4	4	4	2	0				
S 8	Méthode H.....	1,55	1,55	1	0,60	0,40	0				
	Méthode D	1,55	1,55	1,55	1,55	0,80	0				
S 9	Méthode H.....	1,85	1,85	1,15	0,70	0,49	0				
	Méthode D.....	1,85	1,85	1,85	1,85	0,90	0				
S 10	Méthode H	1,10	1,10	0,70	0,45	0,27	0				
	Méthode D.....	1,10	1,10	1,10	1,10	0,50	0				
S 11	Méthode H.....	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,25	1,75	0,65	0,30	0
	Méthode D.....	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	1,55	0,59	0
S 12	Méthode H	2,15	2,15	2,15	2,15	1,95	1,87	1,05	0,62	0,28	0
	Méthode D.....	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	1,40	0,40	0

Nous avons fait la moyenne des dix fractionnements des haptoglobines du type globulinique obtenus par les deux techniques utilisées et nous avons porté les tracés logarithmiques correspondants sur la figure 18. Les moyennes des pentes, c'est-à-dire des constantes K's, sont de 0,78 pour la méthode de fractionnement classique (tracé 1), et de 1,56 pour la technique de diffusion (tracé 2).

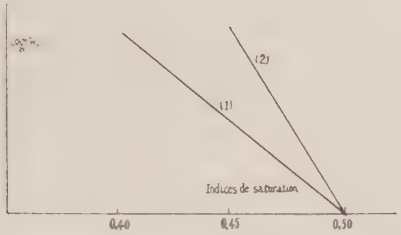

Figure 18. — Tracés statistiques de la précipitation de l'haptoglobine dans 10 sérums humains par le sulfate d'ammoniaque.

10° Précipitation de l'haptoglobine de sérums humains par le phosphate de potassium.

Cette précipitation n'a pas été effectuée dans le but d'établir la courbe de précipitation par les phosphates, mais dans celui de fractionner le sérum aux molarités 1,5, 2, 2,2 et 2,8, afin de procéder, dans le sérum initial et les différents filtrats, aux dosages d'haptoglobine, d'azote total et de sucre libre et protéidique. Nous sommes parti de 5 cm³ de sérum, dans lequel nous avons ajouté une quantité suffisante de la solution équimoléculaire de phosphates 3,5 M, sans dilution préalable, pour obtenir une molarité de 1,5. Sur une partie aliquote du filtrat, la molarité des phosphates a été portée à 2, puis à 2,2 et à 2,8 par la même technique.

On voit sur le tableau XVIII, que dans douze sur treize sérums étudiés, l'haptoglobine est du type globulinique, commence à précipiter un peu avant la molarité

1,5 et est pratiquement totalement précipitée à la molarité 2,2. Dans un seul cas, la précipitation s'effectue entre les molarités 2,2 et 2,8. Ces essais confirment les précédents, en montrant que l'haptoglobine humaine est en règle une globuline, précipitant dans une zone fixe de concentration saline.

TABLEAU XVIII.

Précipitation de l'Haptoglobine de sérums humains par le phosphate de potassium.

Molarités		1,5	2	2,2	2,8
Sérum	Indice initial				
S 1	0,50	0,45	0,25	0	0
S 2	1,38	1,28	0,50	0,10	0
S 3	1,35	1,22	0,52	0,08	0
S 4	1,47	1,34	0,60	0,17	0
S 5	1,32	1,20	0,58	0,20	0
S 6	1,46	1,26	0,90	0,11	0
S 7	1,89	1,70	0,48	0	0
S 8	2,49	2,28	0,42	0	0
S 9	0,78	0,70	0,35	0	0
S 10	3	2,80	0,58	0	0
S 11	1,20	1,16	0,60	0	0
S 12	3,60	3,35	1,27	0,20	0
S 13	3,75	3,75	3,75	3,75	0

Dans cette série d'expériences, nous avons effectué concurremment avec les dosages d'haptoglobine, des dosages de sucre total et de sucre libre par la méthode de Sörensen, de sucre libre par la méthode de Hagedorn, d'azote et de protéines avant et après défécation par l'acide trichloracétique. Nous en avons tiré une idée très générale de la répartition du sucre protéidique. Nous avons, en particulier, remarqué que le sucre globulinique, dans le sérum humain, était nettement plus élevé que le sucre albuminique et que ce dernier, relativement faible chez le sujet normal, avait tendance à s'élever au cours de processus pathologiques.

TABLEAU XIX.

Sérums	Haptoglobine	Sucre Prot. total	Prot. totales	p. 100	Globulines totales			Albumines totales			Sucre libre calc.
					Sucre	Prot.	p. 100	Sucre	Prot.	p. 100	
S 1	2,12	2,190	68,25	3,2	0,330	26,38	1,2	1,860	34,56	5,3	1,980
S 2	1,10	1,632	61,75	2,6	0,180	29	0,5	1,452	32,75	4,4	1,488
S 3	2,60	2,225	85,18	2,6	0,870	59,75	1,4	1,355	25,43	5,3	1,645
S 4	1	1,336	74,25	1,7	0,450	41,12	1	0,886	33,12	2,6	1,664
S 5	2,30	1,590	83,62	1,9	0,180	59,37	0,30	1,410	24,25	5,8	1,800
S 6	3,65	2,395	76,56	3,1	1,440	48,93	2,9	0,955	32,56	2,9	2,105
S 7	1,70	1,865	69,56	2,6	0,990	40,18	2,4	0,875	28,12	3,1	1,675
S 8	2,40	2,171	65,62	3,3	1,380	43,75	3,1	0,791	23,18	3,4	1,489

Dans une seconde série d'expériences portant sur huit sérums de sujets tuberculeux, nous avons modifié notre protocole expérimental. Nous avons opéré à volume constant et nous avons effectué pour chaque indice de saturation, une précipitation sur une quantité identique de sérum, au lieu de reprendre une portion aliquote de chaque filtrat et de lui ajouter une quantité calculée du « mélange phosphates ». Les résultats obtenus furent d'une précision plus rigoureuse et sont mentionnés sur le tableau XIX.

Nos prises d'essai de 1 cm^3 de sérum ont été portées séparément aux molarités 2,17 et 2,8, avec une dilution finale au 1/10. La séparation en globulines et albumines étant ainsi réalisée, nous fîmes une défécation trichloracétique à la même dilution, afin de doser le sucre libre et l'azote protéique. Le sucre protéidique est exprimé sur le tableau XIX en G.M.G., et l'on constate que, pour les protéines totales, il oscille entre 1,3 et 2, 4 g. Pour les globulines, il varie de 0,18 à 1,44 g. et pour les albumines de 0,79 à 1,86 g.

RÉSUMÉ.

La loi de Cohn, valable pour une solution homogène de protéines, ne s'applique plus à la précipitation d'une protéine définie à partir d'un mélange hétérogène, comme le sérum sanguin par exemple.

1°) Le tracé logarithmique de la précipitation saline de l'haptoglobine est rigoureusement linéaire, ce qui indique que ce protéide est une substance homogène et non pas un mélange. La présence de protéines étrangères ne modifie donc pas l'allure logarithmique de la floculation.

2°) Mais la pente du tracé n'est pas une constante, comme dans le cas d'une protéine homogène. Pour une même espèce animale, cette pente se modifie considérablement d'un sérum à l'autre, puisque les limites de précipitation restent identiques pour des indices d'haptoglobine très différents. Elle est une variable, qui est fonction en l'occurrence de la concentration d'haptoglobine dans le sérum. On ne peut donc pas parler, dans le cas d'un mélange de protéines, de constante K's, celle-ci n'étant valable que pour une solution de protéines.

3°) Par contre, la zone de précipitation de l'haptoglobine est, pour un sel donné et un mode opératoire déterminé, une véritable constante caractéristique de la protéine. Pour l'haptoglobine de cheval, le mode opératoire classique et le sulfate d'ammoniaque par exemple, elle se situe entre les indices de saturation 0,5 et 0,65. Pour

l'haptoglobine humaine, elle se trouve dans dix cas sur douze, entre 0,4 et 0,5.

4°) La pente est encore fonction du mode d'introduction de la solution saline et pour les sérums humains, elle devient deux fois plus forte quand on utilise la technique de diffusion.

5°) Pour un sérum donné, la pente de précipitation n'est influencée ni par le pH, ni par la température, ni par la dilution. L'entraînement de l'haptoglobine par la fraction protéique qui la précède, se distingue très facilement, sur le graphique, de sa précipitation proprement dite. Il se traduit par un tracé à pente douce, qui est d'autant plus court que la dilution est plus forte et qui devient inexistant avec la technique de diffusion. Il convient donc, lorsqu'on fractionne le sérum sanguin, d'introduire la solution saturée très progressivement dans le sérum dilué, le procédé de la membrane de collodion rotative représentant le mode idéal.

CHAPITRE IV.

ÉTUDE CLINIQUE DE L'HAPTOGLOBINE.

PREMIÈRE PARTIE.

GÉNÉRALITÉS.

Historique.

Depuis la plus haute antiquité, la médecine est à la recherche de tests sanguins permettant d'apprécier l'état de santé et surtout de dépister les maladies, tout en évaluant leur gravité. GALIEN fut le premier à intégrer dans l'examen clinique du malade, l'observation de la coagulation sanguine. Il remarqua que le caillot sanguin, uniformément rouge chez les sujets normaux, prenait un aspect bicolore au cours des infections les plus variées, qu'elles soient généralisées ou localisées. Il apparaissait alors à la partie supérieure du caillot, une zone blanchâtre, une sorte de couenne ou « phlegma », d'épaisseur variable et dont l'existence fut considérée comme un symptôme cardinal du processus infectieux. Les disciples d'HIPPOCRATE y virent l'élément déterminant fondamental de la pathogénie et ce fut le mythe de l'« état couenneux », qui prévalut jusqu'au 18e siècle. Il s'agissait donc d'extraire de l'organisme par des saignées répétées,

ce principe morbide, cette « materia morbificans », responsable du test sanguin et cause profonde de la maladie. Jusqu'à Sydenham, cette thérapeutique sévit telle une panacée universelle et le même phénomène est décrit dans la littérature médicale des 16e et 17e siècles, sous le nom de « crusta inflammatoria, phlogistica, pleuretica ou lactea ».

Vitesse de sédimentation.

Le temps a passé et ce test de la couenne plasmatique, expliqué par la physiologie du sang et façonné par la technique moderne, est devenu la vitesse de sédimentation globulaire, consacrée par les travaux de Fahreus, Westergreen et de nombreux auteurs contemporains. L'apparition du « phlegma » n'était autre en effet que l'expression physico-chimique du bouleversement de la formule protéique du plasma. Elle traduisait l'accélération de la chute des érythrocytes en pathologie infectieuse et correspondait à un coagulum de plasma privé des éléments figurés sédimentés. Nous savons aujourd'hui que cette chute globulaire n'est pas dûe à une altération des hématies, mais qu'elle révèle une modification profonde de l'ambiance plasmatique.

Quel en est le mécanisme ? Dès 1833, Johann Müller avait déjà reconnu le rôle du fibrinogène. Fahreus en donna la preuve expérimentale et établit en outre la participation des globulines. Longsworth montra récemment qu'il existait un parallélisme entre la vitesse de sédimentation et le taux des globulines. Et voici comment M.-F. Jayle [54] et E. Brissaud interprètent actuellement le phénomène. Selon ces auteurs, la vitesse de sédimentation globulaire mesure indirectement l'agglomération réversible et non spécifique des érythrocytes, qui est conditionnée par trois facteurs : la charge négative des hématies, la fraction électropositive du fibrinogène et un glycoprotéide sérique. Le fibrinogène et le glycoprotéide

entrant en contact, déterminent la formation d'un floculat qui se dépose à la surface globulaire et enveloppe les érythrocytes d'un film protéique visqueux et adhésif. Ces agrégats d'hématies seront d'autant plus volumineux que leurs propriétés de surface et en particulier leur mouillabilité, seront plus profondément modifiées. La sédimentation sanguine permet de se faire une idée des propriétés physico-chimiques et de la structure des protéides sériques qui entrent en jeu et qui constituent le substratum chimique d'un état humoral non spécifique. Elle révèle la présence de cénapses glucido-lipido-protéiques et la formation de fils traduisant l'existence d'une structure fibrillaire ou bien de protéides visqueux et instables, qui se polymérisent facilement en longues chaînes polypeptidiques.

Il s'agit donc en réalité d'un phénomène de floculation que l'on pourrait, croyons-nous, expliquer comme on explique les réactions sérologiques de floculation de Kahn, de Meinicke, du benjoin colloïdal, etc..., en invoquant la neutralisation des micelles colloïdales électronégatives par un colloïde électro-positif. Cette analogie nous amène immédiatement à penser que les facteurs susceptibles d'influencer les résultats de la vitesse de sédimentation seront nombreux et importants. Le pH, le point iso-électrique, peut-être même le potentiel critique de floculation, seront vraisemblablement des éléments qui interfèreront. Il en sera de même, et ceci est actuellement parfaitement démontré, du taux des globules rouges, de la température, de la teneur du plasma en lipides et surtout en cholestérol, du taux de fibrinogène et de certains glycoprotéides, de la tension superficielle, des sels biliaires, de la viscosité du plasma, etc... Et c'est ainsi qu'on trouvera des chiffres de sédimentation très anormalement élevés dans les anémies, dans l'hypercholestérolémie de la grossesse, dans quelques états endocriniens, etc... La détermination de la variable dominante en pathologie infectieuse, qui est de nature globulinique, peut donc se trouver

faussée et n'être en réalité que la résultante de la variation de plusieurs facteurs. On voit donc que le test de Westergreen, actuellement très employé pour sa simplicité technique, peut parfois poser au clinicien des problèmes difficiles à résoudre.

Indice d'haptoglobinémie.

Un grand progrès fut accompli le jour où M.-F. Jayle et E. Brissaud montrèrent l'existence d'un rapport de cause à effet entre l'accélération de la chute des érythrocytes et l'accroissement du taux de l'haptoglobine. De là à identifier cette dernière avec la globuline responsable des modifications physico-chimiques du sang, il n'y avait qu'un pas. Celui-ci fut scientifiquement franchi, lorsqu'on eut établi la constitution chimique de l'haptoglobine. Cette découverte transposait le problème sur le plan de la biochimie médicale et fournissait à la clinique une méthode précise d'investigation. Il ne s'agit plus, en effet, de la détermination approximative d'un complexe formé d'éléments variables, mais d'un véritable dosage d'une substance parfaitement définie, qui n'est absolument pas influencé par la présence de tel ou tel autre corps et qui s'avère aussi rigoureux, aussi précis que la titration d'un acide par une base. C'est ce qui est réalisé dans les techniques de dosage de l'haptoglobine déjà décrites et qui fournissent aux cliniciens ce test d'une grande spécificité chimique, reposant sur un mécanisme univoque : l'indice d'haptoglobinémie, que l'on symbolise par l'abréviation Hi.

En pratique, on exprime le taux du sérum en haptoglobine par une échelle dont les limites extrêmes sont 0 et 10. Plus de 10.000 déterminations ont actuellement été effectuées, qui permettent de fixer d'une façon précise, les différentes zones de variation de l'indice d'haptoglobinémie. La zone normale s'étend de 0 à 1,3. Chez les individus sains, l'indice Hi constitue une véritable constante physiologique indépendante de l'alimentation, de

l'âge, du sexe, de la fatigue quotidienne, du cycle ovarien chez la femme. Chez un même sujet, les différences d'un examen à l'autre n'excèdent guère 0,2. Les adultes normaux ont le plus souvent des indices compris entre 0,5 et l'unité ; cette élévation légère, habituelle, fait le bilan des petites infections et auto-intoxications latentes, compatibles avec un état de bonne santé apparente et donne un élément d'appréciation sur la qualité physiologique d'un sujet. Cet indice s'abaisse chez les adolescents et tombe à zéro pour les nouveaux-nés dont le sang, fait remarquable, ne contient pas trace d'haptoglobine. Mais il suffit cependant d'une infection quelconque pour qu'il s'élève notablement, redevenant voisin de zéro, quand l'état s'est normalisé. La zone dite d'« alarme » se situe entre 1,3 et 1,5. Elle correspond aux sujets fatigués, dont l'indice peut même s'élever jusqu'à 1,8. Il s'agit alors de l'« état non spécifique » des auteurs allemands, qui doit être réservé à tous les cas où la clinique ne peut déceler une affection évolutive.

Au-dessus de ce chiffre, nous sommes dans la zone nettement pathologique. Cette augmentation de Hi est constatée toutes les fois qu'un processus infectieux entre en jeu, quels que soient sa nature et son siège, qu'il soit localisé ou généralisé. Les taux pathologiques oscillent le plus souvent entre 2 et 4, mais peuvent monter jusqu'à 7 et même 8. Les valeurs les plus importantes se rencontrent dans les suppurations graves, comme la gangrène pulmonaire par exemple. Les foyers de pneumonie et de bronchopneumonie déclenchent eux aussi de fortes élévations. Vive réaction également dans les inflammations des séreuses articulaires ou pleurales, où les chiffres observés sont même souvent disproportionnés avec la cause pathologique. Quant aux affections rhumatismales, elles offrent un champ d'application de Hi particulièrement intéressant : tous les rhumatismes d'origine inflammatoire, infectieux ou non (maladie de Bouillaud, rhumatismes chroniques infectieux, arthrosynovies, spondylarthrites ankylosantes, goutte, arthrites infectieuses,

monoarthrites subaiguës, polyarthrites évolutives, etc...) donnent des chiffres très anormaux. Parmi les néphrites, ce sont les formes aiguës et sub-aiguës qui atteignent les taux les plus élevés, d'où le rapprochement qu'on a pu faire avec l'hyperprotéidoglycémie constatée par Bierry et ses élèves. Les tumeurs malignes provoquent généralement une élévation précoce de l'indice, mais celle-ci peut rester discrète si la forme considérée n'est pas ulcérée ou infectée. Les localisations digestives semblent donner les plus fortes variations et les chiffres rétrocèdent sous l'influence de la radiothérapie.

Cet accroissement de l'indice accompagne donc, on le voit, les infections les plus diverses, mais le champ d'observation optimum nous a paru être celui de la tuberculose. C'est une question à laquelle nous avons consacré plusieurs années et nous lui réserverons un chapitre spécial.

A côté des observations que nous venons de relater, il se trouve des cas, où nous assistons au contraire à une inversion du signe des variations de l'haptoglobine sérique. Nous en citerons comme type, les syndrômes hémolytiques (ictères), qui entraînent constamment une véritable annulation de l'indice. Comment expliquer ce phénomène en apparence paradoxal ? Nous aurons recours aux hypothèses formulées par M. Polonovski [55], qui pense au blocage de l'haptoglobine de ces plasmas par un chromoprotéide résultant de la dégradation de l'hémoglobine et formant un complexe dénué d'activité « auxoperoxydasique ». Ce chromoprotéide serait, selon cet auteur, la bilirubinoglobine, dont il a démontré la présence dans tous les sérums donnant lieu à la réaction indirecte au diazonium d'Hijmans van der Bergh pour la recherche de la bilirubinémie. L'haptoglobine se trouverait ainsi dissimulée à sa réaction de dosage habituelle et sa disparition deviendrait un élément caractéristique de l'hémolyse.

Mais ce blocage explique-t-il les cas d'annulation de l'indice d'haptoglobinémie constatés en dehors de mani-

festations d'hémolyse sanguine ? Explique-t-il, par exemple, la chute à zéro de l'indice survenant parfois à la période préterminale des états cachectiques, ou bien au cours des insuffisances hépatiques graves ? M.-F. Jayle et Polonovski pensent qu'il s'agit plutôt ici d'une défaillance, d'une déchéance brutale du système générateur d'haptoglobine, qui est vraisemblablement le foie. La cellule hépatique semble en effet particulièrement propre au métabolisme de cette substance, qui doit relever d'un processus enzymatique simple, si l'on en juge par la rapidité étonnante avec laquelle elle se produit : le taux de ce protéide circulant peut doubler ou tripler du jour au lendemain.

Ce blocage peut-il d'autre part expliquer le fait que Hi soit nul chez le nourrisson pendant les premières semaines de la vie ? Doit-on penser à un processus hémolytique discret, dont l'ictère apparent des nouveaux-nés ne serait qu'une manifestation exagérée ? Ou bien ne serait-ce pas là au contraire un test d'absence totale d'infection antérieure ? Le nouveau-né est parfaitement capable de réaliser la synthèse de l'haptoglobine, puisqu'au cours d'infections les plus variées son indice peut atteindre des valeurs extrêmement élevées. Quand elles évoluent vers la guérison, le taux de l'haptoglobine diminue rapidement et, après la convalescence, on n'en trouve plus que des traces dans le plasma circulant. Aussi peut-on admettre, avec M.-F. Jayle, que l'haptoglobine est un protéide pathologique qui n'existe qu'à l'état de traces dans les organismes neufs et en parfaite santé. Elle n'apparaîtra plus tard, à des taux faibles, que pour signaler l'existence de petites toxémies compatibles avec l'état de bonne santé apparente. Notons cependant, qu'un certain nombre de sujets adultes ont des indices d'haptoglobine voisins de zéro.

Pour terminer cette revue des différents cas cliniques au cours desquels fut pratiqué ce test plasmatique, signalons que l'indice d'haptoglobine reste normal dans

certaines manifestations morbides comme les affections organiques bien tolérées, les affections neurologiques d'origine vasculaire ou toxique, les troubles endocriniens ou encore les traumatismes, les infirmités, les hernies....., à la condition bien entendu qu'aucun processus infectieux ne vienne s'y superposer.

Variations du taux de l'haptoglobine au cours de la tuberculose expérimentale.

Il était intéressant d'entreprendre une étude analogue des variations de l'indice d'haptoglobinémie dans le domaine expérimental, et c'est ce qu'ont réalisé, à Lille, Ch. Gernez-Rieux, Warembourg et Crampon [56] en s'adressant au cobaye. Ils suivirent les techniques de dosage classiques et opérèrent sur du sérum prélevé par ponction cardiaque. Ils dosèrent tout d'abord l'haptoglobine chez un certain nombre de cobayes neufs, adultes et soumis à une nourriture normale. Ils trouvèrent des chiffres allant de 0 à 0,38 pour le lot considéré et constatèrent que pour un même animal, l'indice d'haptoglobinémie était, comme chez l'homme, très constant et indépendant du régime alimentaire. Ils procédèrent alors, pour une partie de ce lot, à l'inoculation sous-cutanée d'une émulsion de culture sur Löwenstein de bacilles tuberculeux humains virulents. Les doses injectées variaient entre 1/2 et 1/10 de milligramme de bacilles. Des ponctions cardiaques répétées tous les dix à quinze jours, permirent aux auteurs de suivre les variations de l'haptoglobine chez ces animaux. Ils constatèrent dans tous les cas une élévation considérable de l'indice Hi, pouvant atteindre jusqu'à 25 fois sa valeur initiale. Cette hyperhaptoglobinémie commençait généralement à se manifester dès le quinzième jour, pour atteindre son maximum du vingtième au trentième jour après l'inoculation. La réaction est donc extrêmement précoce. Mais l'indice ne se maintient élevé que pendant quelques semaines et tend ensuite progressivement vers une valeur voisine de

zéro, à laquelle il reste jusqu'à la mort de l'animal. Ce phénomène paraît résulter de l'altération de l'état général et correspond à l'observation faite en médecine humaine chez les cachectiques à la période prémortelle.

Ces recherches expérimentales montrent donc que les réactions humorales du cobaye présentent, sur le plan de l'haptoglobine, de grandes analogies avec les réactions observées chez l'homme.

Raison physiopathologique de l'haptoglobinémie.

Quelle est la raison physiopathologique de l'haptoglobinémie ? Comment expliquer l'apparition de cette globuline et ses différentes variations au cours de syndromes si variés ? Il est bien démontré actuellement que l'haptoglobine n'est pas liée aux modifications humorales qui caractérisent l'apparition d'anticorps et qu'elle ne joue aucun rôle dans la défense spécifique de l'organisme. M.-F. Jayle et A. Bonnefoi [57] recherchèrent l'activité sérologique de toute une série de fractions des protéines d'un sérum de cheval antityphoïdique et observèrent que les anticorps se trouvaient dans la fraction des pseudoglobulines ne contenant pas trace d'haptoglobine. D'autre part, Ch. Gernez-Rieux et ses collaborateurs, dans leurs expériences sur les cobayes, firent des constatations analogues. Après vaccination de ces animaux par l'anatoxine diphtérique, par le vaccin T.A.B. de l'Institut Pasteur et malgré l'apparition des témoins humoraux de l'immunité (antitoxines, agglutinines spécifiques...), ils retrouvèrent le même indice d'haptoglobinémie. Même observation après vaccination par des microbes vivants atténués : l'inoculation sous-cutanée d'une souche de B.C.G. n'entraîna aucune modification de l'indice. Il n'y a donc aucune relation pathogénique à établir entre l'élaboration des anticorps spécifiques et de l'haptoglobine. D'ailleurs, la localisation de cette dernière dans la mosaïque des protéines plasmatiques, vient encore renforcer cette notion : nous avons vu en effet au cours du pre-

mier chapitre, qu'elle appartenait à la fraction α des globulines « aspécifiques », par opposition à la fraction γ des globulines spécifiques.

E. Brissaud avait tout d'abord pensé qu'il existait un véritable rapport de cause à effet entre l'infection et l'haptoglobinémie. L'élargissement de l'investigation clinique n'est plus en accord avec une telle hypothèse. On trouve en effet des indices très élevés au cours de la nécrobiose aseptique des tumeurs malignes ou bénignes, au cours de certaines néphrites chroniques en dehors de toute poussée inflammatoire et au cours de nombreux syndrômes toxiques qui ne s'accompagnent pas d'une modification de la formule leucocytaire.

Il fallait donc trouver une autre hypothèse. Ce sont les travaux de Bennhold [58] qui donnèrent la clef du rôle physiopathologique de l'haptoglobine. Cet auteur a, en effet, mis en lumière d'une façon très nette le rôle primordial joué par les protéines sériques dans le transport de nombreuses substances, véhiculées dans le plasma grâce à l'établissement de liaisons d'association plus ou moins labiles. On peut apparenter ces combinaisons à celles que contracte l'oxygène sur l'hémoglobine. L'ultrafiltration ou la cataphorèse les mettent en évidence. Elles sont parfois si fragiles que la simple dialyse suffit à en entraîner la rupture. Certaines substances peuvent être liées sous plusieurs formes : ainsi, la bilirubine dissimulée n'est pas ultrafiltrable ; pas plus d'ailleurs que celle qui est révélée par le dosage direct. Elles suivent l'une et l'autre la migration cataphorétique de la sérum-albumine. L'urobiline, les sels biliaires, l'acide urique, sont également liés. A ce sujet, il est intéressant de constater que les uro-porphyrines du type 1 et 3, qui ne forment pas de liaisons protéiques, ont une toxicité très élevée.

Au contraire, les copro-porphyrines du type 1 et 3, se fixent sur les albumines et sont parfaitement bien supportées grâce à l'effet dissimulateur et protecteur que réalise cette association.

Ce rôle de protection, de blocage, avait d'ailleurs été entrevu depuis bien longtemps, puisqu'Hippocrate disait déjà : « Tout ce que la nature ne peut éliminer, elle le bloque ». Il est vraisemblable que cette fonction de transport est l'apanage d'un groupe spécialisé de protéines qui véhiculent ainsi pigments, toxines, déchets d'origine tissulaire, médicaments, etc..., en neutralisent les effets toxiques et les entraînent dans le tissu réticulo-endothélial qui les détruit, les modifie ou les élimine. Cette propriété donne lieu « in vitro » à l'effet embatique des protéines, qui exprime leur pénétration à travers un gel de gélatine.

L'haptoglobine semble faire partie de ce groupe protéique spécialisé et apparaît comme le support biochimique de cette importante fonction de détoxication humorale. Elle participe également au catabolisme de l'hémoglobine, car chaque fois qu'un globule rouge est lysé dans le sang circulant, l'hémoglobine libérée se combine à l'haptoglobine du plasma. Ce complexe « Hb-Hp » doit ensuite être scindé au niveau du tissu réticulo-endothélial, l'hémoglobine étant transformée en bilirubine et l'haptoglobine se trouvant jetée de nouveau dans la circulation. Les nécessités de transport sont fonction de la demande de l'organisme et il est logique de penser qu'elles sont notablement accrues chaque fois que, pour une raison pathologique quelconque, il existe une désintégration cellulaire. L'haptoglobine intervient ainsi dans la mesure où l'organisme doit lutter contre des substances toxiques d'origine exogène ou endogène. Elle traduit et titre en quelque sorte la toxémie [**59**].

On devine toute l'importance que peut prendre, en clinique, l'introduction d'un élément nouveau de détermination quantitative de la toxémie. Nous verrons tout à l'heure, comment on peut utiliser l'indice d'haptoglobinémie dans le domaine de la tuberculose pulmonaire. Mais n'oublions pas que ce test présente une non-spécificité absolue et qu'il possède, de ce fait, des applications

multiples. En médecine sociale, son utilisation dans un but de dépistage constitue une méthode extrêmement sensible de surveillance et de contrôle des collectivités. Tout indice anormalement élevé devra attirer l'attention du médecin sur l'existence d'un trouble de nature indéterminée. En raison de sa sensibilité, il peut n'être que le retentissement d'un épisode grippal ou inflammatoire transitoire. Le clinicien éliminera donc toutes les causes infectieuses banales et, si l'indice se maintient élevé au cours de plusieurs examens successifs, il devra penser à une affection plus grave. Le retour à un taux normal sera un test précieux de guérison. Il est parfois difficile en effet, de saisir la transition entre la convalescence et la guérison totale, par le seul examen clinique. Le retour de l'indice à un taux voisin de l'unité, acquiert une grande valeur pour confirmer cette dernière. En outre, le tracé de ses variations intermédiaires traduira l'évolution de la maladie et permettra de juger de l'effet d'une thérapeutique.

L'haptoglobinémie n'est, en fait, qu'un élément nouveau de mesure, qui vient renforcer la symptomatologie générale et dont l'interprétation nécessite un grand esprit critique, toutes les fois que son taux s'avère supérieur à la normale. Ce test n'a pas pour but de simplifier la médecine, mais, comme beaucoup de techniques de laboratoire, d'approfondir l'examen du malade, en le rendant à la fois plus complexe et plus scientifique. Il indique le sens et l'importance de la déviation de la formule proteique du sérum, vers le déséquilibre pathologique. L'haptoglobine représente une protéine de transport, sans doute spécialisée, existant normalement à un taux d'autant plus bas que l'organisme est plus jeune et devenant, chez l'adulte sain, une véritable constante de la qualité biologique individuelle.

On découvre tout le chemin parcouru depuis le temps où Galien observa, pour la première fois, la formation du caillot plasmatique. Soumis à l'investigation scientifique, ce phénomène du « phlegma » livre tous ses secrets biochimiques et cliniques et l'haptoglobine ne fait

en somme que réhabiliter le test sanguin antique sous un aspect moderne. Elle substitue à l'appréciation visuelle des anciens, une mesure précise du déséquilibre introduit dans la formule protéique du plasma par une cause pathologique indéterminée. Elle est une réaction du terrain, et non de défense de l'organisme, qui fournit à la clinique une évaluation de la toxémie.

DEUXIÈME PARTIE.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nous nous empressons d'adresser ici aux personnalités du Service Médical de la S.N.C.F. « Est » et du Sanatorium de Sericourt, nos remerciements les plus vifs pour le concours précieux qu'ils nous ont apporté dans cette partie de nos recherches.

A M. le Docteur Bidermann, Médecin-Chef du Service Médical, qui, dans un esprit de large compréhension auquel nous rendons hommage, a bien voulu mettre à notre disposition l'appareillage nécessaire pour les dosages d'haptoglobine et a accepté d'emblée le principe de nos prises de sang systématiques.

A M. le Docteur Mery, Médecin-Directeur du Sanatorium de Sericourt, qui nous a facilité à l'extrême notre expérimentation, nous a constamment éclairé de ses conseils avec une haute compétence médicale, nous a prodigué son temps sans compter, nous a, en un mot, rendu possible notre travail.

A M. le Docteur Lerolle, qui fut, avec des qualités exceptionnelles de rigueur et de méthode, notre collaborateur direct dans le domaine expérimental comme dans le domaine statistique et nous a considérablement allégé notre tâche.

A M. le Docteur Alibert, qui a bien voulu compléter pour nous ses examens systématiques et nous a permis de suivre les malades après leur sortie du Sanatorium,

malgré toutes les difficultés qu'une telle entreprise impliquait.

Notre travail de recherches dans le domaine clinique, effectué en collaboration avec MM. Mery, Lerolle et Alibert, a porté exclusivement sur les sujets tuberculeux hospitalisés au Sanatorium de la S.N.C.F. de Sércourt et convoqués ensuite périodiquement au Service Médical de la Région « Est », à Paris. Il se divise en trois parties.

Nous avons tout d'abord essayé d'établir un parallèle entre les mesures de la vitesse de sédimentation globulaire d'une part, et celles de l'indice d'Haptoglobine d'autre part. Nous avons, dans ce but, pratiqué systématiquement ces deux tests sanguins chez un certain nombre de malades, à l'occasion de la même prise de sang. Nous nous trouvions ainsi dans des conditions idéales de comparaison.

Nous avons ensuite réalisé de vastes séries de dosages d'Haptoglobine, afin de tracer, pour chaque malade, l'haptoglobinogramme correspondant à leur séjour au Sanatorium. Plus de 1.700 indices ont ainsi été mesurés : indices d'entrée, indices de sortie et indices intermédiaires en cours de traitement. L'expérience a montré qu'un haptoglobinogramme, pour être complet et facilement interprétable, devait comprendre au minimum des indices bimestriels. Il faut éviter, en effet, de laisser un chiffre trop isolé, celui-ci ne pouvant avoir, dans ces conditions, de valeur absolue. L'étude de ces haptoglobinogrammes a finalement été reprise d'une façon systématique et les conclusions qui s'en dégagent font l'objet de notre seconde partie.

La troisième partie concerne le pronostic d'avenir des malades sortis du Sanatorium, en fonction de leurs indices d'Haptoglobine. Il nous a en effet été possible, comme nous le verrons, de suivre un grand nombre d'entre eux, grâce à des visites médicales périodiques et d'effectuer, à cette occasion, plus de 1.300 déterminations d'indices.

Haptoglobine et vitesse de sédimentation.

Nous avons effectué simultanément 404 mesures de vitesse de sédimentation et d'indices d'haptoglobine chez des malades hospitalisés au Sanatorium de Sérieourt. Les résultats ont été portés sur un tableau statistique, les vitesses de sédimentation étant inscrites en abscisse et les indices d'haptoglobine en ordonnée. Nous avons éliminé 35 résultats pour lesquels il y avait une discordance flagrante entre les deux valeurs. Dans ces cas, il n'est pas douteux qu'un facteur inconnu a influencé la vitesse de sédimentation, soit en l'inhibant, soit en l'augmentant

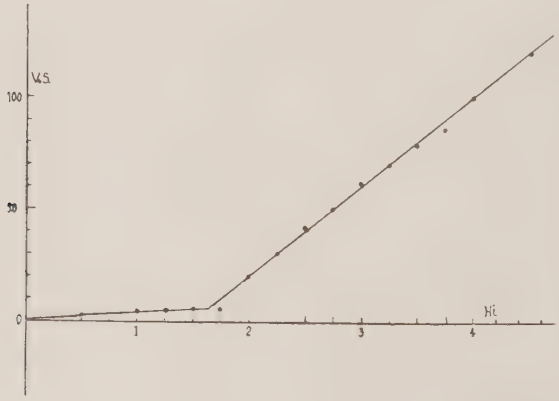

FIGURE 19. — Haptoglobine et vitesse de sédimentation.
Ordonnée : Vitesse de sédimentation VS.
Abscisse : Indice d'haptoglobine Hi.

considérablement. Les 369 sérums restants ont été classés en fonction de leur Hi, chaque catégorie représentant une tranche de 0,25 sur l'échelle des indices d'haptoglobine (de 0 à 0,25 ; de 0,25 à 0,50 ; de 0,50 à 0,75, de 0,75 à 1, etc...) Dans chaque catégorie, nous avons fait la moyenne des Hi et des VS et nous avons porté les résultats sur le graphique 19. On constate, sur cette figure, que les points expérimentaux situés entre les Hi 1,7 et 4,5

sont sur une droite. Cela signifie qu'il existe une relation linéaire entre la concentration de l'haptoglobine et la vitesse de sédimentation. Ces résultats confirment ceux que E. Brissaud a obtenus sur mille malades.

Les travaux classiques rendent le fibrinogène et les globulines responsables de l'accélération de la chute des érythrocytes. Des formules empiriques ont été proposées pour exprimer ces relations, mais elles sont loin d'avoir la netteté impressionnante des rapports qui existent sur notre graphique. Sans doute peut-on en déduire, comme nous l'avons vu, que l'haptoglobine représente la fraction globulinique intéressée dans ce phénomène et sans doute représente-t-elle la variable dominante du couple globulines-fibrinogène.

Ces résultats n'ont pas un seul intérêt théorique. Ils indiquent également la supériorité indiscutable de l'indice d'haptoglobine sur la vitesse de sédimentation. Nous reviendrons plus tard sur les 35 sérums discordants, n'envisageant ici que les sérums qui présentent un Hi inférieur à 1,7. Que nous les considérions individuellement ou que nous en effectuions la moyenne par catégorie, nous constatons que si l'indice d'haptoglobine est inférieur à 1,7, il n'existe plus aucune proportionnalité entre les deux variables. Un sérum ayant un Hi = 1,5 pourra avoir une sédimentation plus faible qu'un sérum dont l'indice est de 0,5. Tout se passe comme si l'haptoglobine n'exerçait son action sur la vitesse de chute des érythrocytes, qu'au delà d'un certain seuil de concentration que nous fixons à 1,7 et que E. Brissaud situait aux environs de 1,5, sans toutefois l'avoir précisé par une méthode rigoureuse. Pour les sérums dont l'indice est inférieur à 1,7, ce sont les multiples variables dont nous avons déjà parlé, qui vont influencer la chute globulaire (température, nombre des hématies, lipoïdes sériques, etc...). Au contraire, avec l'haptoglobine, la méthode conserve toute sa rigueur entre 0 et 1,7. Or l'étude clinique prouve qu'il existe des tuberculoses évolutives dont l'indice est com-

pris entre 1,3 et 1,7 et que les chiffres inférieurs à l'unité ont une valeur clinique certaine, car ils permettent d'affirmer l'absence d'évolutivité et, dans de nombreux cas, la consolidation d'une guérison.

Il nous a paru intéressant d'inclure dans notre exposé la série des équivalences entre vitesse de sédimentation et indice d'haptoglobine. Nos résultats statistiques figurent sur le tableau XX.

TABLEAU XX.

Correspondance moyenne des indices d'haptoglobine et de la vitesse de sédimentation.

Hi	VS (1 heure)
0 à 0,5	2
0,55 à 1	4
1,05 à 1,25	4,5
1,30 à 1,50	5
1,55 à 1,75	5,5
1,80 à 2	20
2,05 à 2,25	30
2,30 à 2,50	42
2,55 à 2,75	50
2,80 à 3	62
3,05 à 3,25	70
3,30 à 3,50	79
3,55 à 3,75	86
3,80 à 4	100
4,05 à 4,50	120

Revenons maintenant aux 35 cas pour lesquels il existe une discordance entre les deux méthodes d'investigation. Avec MM. Mery et Lerolle, nous nous sommes adressés à la clinique pour savoir quelle était la méthode qui se trouvait en défaut. Nous les avons classés en deux catégories, selon que Hi était supérieur ou égal à 1,7, et VS inférieure ou égale à 10, ou, au contraire que Hi était inférieur à 1,7 et VS supérieure à 10. Dans chaque catégorie, nous avons distingué les cas où la discordance était flagrante et ceux où elle était moins importante. Dans les 20 cas où l'haptoglobine était supérieure à 1,7 et la

vitesse de sédimentation inférieure à 10, la clinique a donné raison 16 fois à l'haptoglobine et 4 fois seulement à la sédimentation. Dans les 15 cas de la seconde catégorie, l'haptoglobine compte dix points contre cinq pour la sédimentation. (Tableau XXI).

Mais, en la circonstance, la clinique, même bien étudiée, ne peut-être qu'un juge approximatif et il nous semble préférable, pour apprécier la valeur des résultats, de comparer la rigueur technique des procédés utilisés. L'haptoglobine apparaît alors comme une méthode spécifique et très précise, et la vitesse de sédimentation comme un procédé peu précis, parce qu'influencé par de multiples facteurs. La méthode de BIERNACKI-WESTERGREEN n'en conserve pas moins une valeur pratique certaine et une supériorité appréciable sur le plan de la rapidité et de la simplicité d'exécution.

Etude de l'indice d'haptoglobine au cours du traitement de la tuberculose pulmonaire.

Le tableau XXII présente une classification de 307 malades du Sanatorium de Séricourt, en fonction de leur indice d'haptoglobine Hi, qui est porté en ordonnée, et de l'évolution de leurs lésions tuberculeuses, en abscisse. Il s'agit, en l'occurence, de l'indice le plus élevé que ces malades ont présenté au cours de leur hospitalisation. On constate que, quand l'indice est inférieur à 2,5, 191 malades sur 193 ont évolué favorablement. Ils sont sortis du sanatorium cliniquement guéris et jugés aptes à reprendre leur travail. L'indice Hi = 2,5 semble être une ligne de démarcation, puisque, lorsqu'il est dépassé, le pourcentage des évolutions défavorables augmente proportionnellement. Ce pourcentage passe en effet de 38 p. 100, quand l'indice est compris entre 2,5 et 3, à 50 p. 100 entre 3 et 3,50, à 66 p. 100 entre 3,50 et 4 et à 80 p. 100 au-dessus de 4. Il ne s'agit évidemment pas d'une règle absolue et une évolution tuberculeuse défavorable est par-

TABLEAU XXI.

Sérums	VS	Hi	Discordances moyennes		Discordances importantes	
			VS en défaut	Hi en défaut	VS en défaut	Hi en défaut
Hi ≥ 1,7 VS ≤ 10						
Sérum V.....	8	1,85	+			
Sérum B.....	6	2,85			+	
Sérum B.....	4	1,80				+
Sérum G	5	1,95				+
Sérum T.....	5	1,90				+
Sérum P.....	4	1,75			+	
Sérum S.....	5	2,25			+	
Sérum P.....	7	2			+	
Sérum B.....	6	1,85	+			
Sérum S.....	8	1,90	+			
Sérum G	7	2			+	
Sérum P.....	4	2,20			+	
Sérum V	9	2,10			+	
Sérum P.....	1	1,85			+	
Sérum Q	6	2,15			+	
Sérum F.....	4	2				+
Sérum R	3	2			+	
Sérum P.....	4	3			+	
Sérum L.....	5	2			+	
Sérum P.	8	2,65			+	
Hi < 1,7 VS > 10						
Sérum P	17	1,45			+	
Sérum P.....	18	1,30			+	
Sérum M	38	1,50			+	
Sérum O.....	21	1,40				+
Sérum B.....	20	1,55		+		
Sérum V	19	0,84			+	
Sérum V	27	1,45			+	
Sérum T.....	31	1,55			+	
Sérum L	15	1,40	+			
Sérum T.....	49	1,05			+	
Sérum L	45	1,25				+
Sérum D	17	1,30			+	
Sérum P.....	21	1,30			+	
Sérum M	21	1,35				+
Sérum M	17	1,15				+

faitement compatible avec des taux d'haptoglobine relativement bas. Néanmoins, on tire de ces observations, l'impression d'ensemble que le pronostic est d'autant plus grave que Hi est plus élevé et, lorsque ce dernier dépasse 3, l'évolution est fatale dans une très forte proportion de cas.

Il n'est pas question de présenter ici l'étude clinique détaillée de tous les malades pour lesquels nous avons établi l'haptoglobinogramme. Nous résumerons seulement les conclusions qui se dégagent de ce long travail, en disant que l'haptoglobinogramme, dans l'immense majorité des cas, traduit très fidèlement l'évolution clinique. Au départ, il chiffre l'intensité de l'évolutivité et il représente un compromis entre la virulence des bacilles de Koch et la résistance du terrain. Il comporte, de ce fait, un élément pronostic indéniable, bien qu'il n'autorise nullement à tirer une déduction sur l'efficacité de la collapsothérapie, avant que celle-ci soit instituée. Cependant, pour le docteur Méry, un indice supérieur à 4 s'oppose de façon presque formelle à toute tentative de collapsothérapie chirurgicale. Dans les cas où, malgré cet indice élevé, on a voulu intervenir, les résultats ont été défavorables. Il vaut mieux attendre, pour opérer, que l'indice soit descendu au-dessous de 3.

Quand la collapsothérapie est réalisée, l'haptoglobinogramme permet rapidement d'en saisir les effets. Lorsqu'ils sont favorables, la pente est d'autant plus forte, que l'efficacité de la thérapie est plus certaine. Dans ce cas, les indices rejoignent bientôt la zone normale. Si le collapsus est inefficace, l'indice demeure en plateau dans la zone pathologique, ce qui assombrit considérablement le pronostic. Cette conception de la pente du tracé de l'haptoglobinogramme semble avoir un intérêt tout particulier. Nous avons eu, à ce sujet, des cas typiques. Ainsi, les 5 malades figurant sur notre tableau (tableau XXII), avec un indice supérieur à 4, et qui se sont acheminés vers la guérison, ont présenté des chutes extrêmement

rapides de leurs indices. Leur évolution s'est avérée plus favorable que celle de certains malades dont les indices, quoique moins élevés, se maintenaient sur un haptoglobinogramme en plateau, sans tendance bien nette à revenir vers la zone normale.

TABLEAU XXII.

Hi.	Evolution favorable pendant la cure	Evolution défavorable pendant la cure	Pourcentage des évolutions défavorables
< 1,3	59	0	0 p. 100
1,3-1,5	43	0	0 p. 100
1,5- 2	49	0	0 p. 100
2 -2,5	40	2	4,7 p. 100
2,5- 3	27	17	38 p. 100
3 -3,50	12	12	50 p. 100
3,50- 4	7	14	66 p 100
> 4	5	20	80 p. 100

(Les nombres portés sur le tableau représentent les sujets des catégories correspondantes).

Les accidents qui peuvent survenir au cours d'un traitement, se répercutent toujours sur l'haptoglobinogramme, s'ils ressortissent d'un processus évolutif. Les réactions liquidiennes, comme les pleurésies sérofibrineuses, s'accompagnent d'une forte élévation du taux de l'haptoglobine. Il en est de même chaque fois qu'une séreuse est touchée par un processus inflammatoire.

L'élévation de l'indice d'haptoglobine ne fait-elle qu'accompagner les signes cliniques ou radiologiques qui traduisent une poussée évolutive ? Ou bien, au contraire, cette élévation est-elle précoce et précède-t-elle ces signes, permettant ainsi de prévoir, à plus ou moins longue échéance, une poussée évolutive chez un sujet paraissant cliniquement guéri ou stabilisé ? On conçoit, dans ce dernier cas, quel secours précieux ce test apporterait au phtisiologue, soit au cours des examens systématiques pour préciser le degré d'activité de lésions

n'ayant qu'une expression radiologique, soit à la sortie du sanatorium pour affirmer ou non la qualité d'une guérison, soit au cours des examens périodiques que subiront les sujets cliniquement guéris après leur sortie, pour dépister précocement une rechute éventuelle. Les observations que nous avons recueillies avec MM. Méry et Lerolle, et qui sont évidemment encore insuffisamment nombreuses, semblent bien montrer que l'élévation de l'indice d'haptoglobine peut parfois précéder de quelques mois, les signes cliniques et radiologiques d'une poussée évolutive. Nous en citerons quelques exemples, sous forme d'observations résumées.

Observation N° 1 : M. B.....

Lobite supérieure droite excavée, traitée par un pneumothorax créé à Bichat en décembre 1942. Entrée au Sanatorium de Sércourt le 18 février 1943. Section de brides le 15 mars 1943. Pneumothorax rapidement efficace. Epanchement liquidien sans gravité.

A sa sortie du Sanatorium, excellente guérison apparente, toutes les bacilloscopies sont négatives depuis le 26 avril 1943. Disparition de toute image cavitaire dans le moignon pulmonaire. Poumon gauche normal. Reprise de poids de 11 kg. Mais l'indice d'haptoglobine de sortie est de 2,30, alors qu'il n'était que de 1,50 le 12 octobre (2 mois avant la sortie).

Malgré cet indice élevé, étant donné que tous les autres signes semblent affirmer la guérison, on laisse sortir le malade avec reprise de service. Ce dernier reprend effectivement son service après une convalescence de 4 mois et travaille 8 mois. Son indice se maintient constamment à 2. En janvier 1945, arrêt de travail pour hémoptysie. Bascilloscopie positive. A la radio, bilatéralisation avec caverne gauche. Admis de nouveau à Sércourt en février 1945. Indice d'haptoglobine d'entrée : Hi = 4,20. Création d'un pneumothorax gauche efficace. Sort du Sanatorium le 20 décembre 1945 avec un indice Hi = 1,50 et un excellent état.

Observation N° 2 : M. F.....

En avril 1944, après un épidose grippal, constatation d'une opacité du sommet droit. Pas d'arrêt de travail. Suivi au Service Médical de Paris, en septembre et décembre 1944.

Son indice d'haptoglobine est alors de 1,28. En février 1945, celui-ci est monté à 1,86. En décembre 1945, arrêt de travail. Image cavitaire au sommet droit.

Entrée au Sanatorium avec un indice égal à 2.

Observation N° 3 : M. D.....

A l'examen des rapatriés, en janvier 1943, on découvre des lésions pulmonaires à la radio. Séjour de 6 mois à Villiers-sur-Marne. Bacilloscopies constamment négatives. Est alors suivi au Service Médical. Son indice d'haptoglobine est de 2,60 le 30 décembre 1943. Malgré ce chiffre élevé, reprise de travail en janvier 1944. Le 4 avril 1944, indice de 2,90. Le 9 août 1944, arrêt de travail. Caverne droite et bacilles.

Observation N° 4 : M. V.....

Premier séjour à Sércourt en 1939. Cliniquement guéri à la sortie. Rechutes légères jusqu'en 1942. Stabilisé à partir de 1942. Haptoglobinémie normale jusqu'en février 1945. L'indice s'élève alors à 1,44 et il atteint 2,16 en décembre 1945, sans que le malade juge nécessaire d'arrêter son travail. Il y est cependant contraint en février 1946. Caverne droite et bacilles.

Observation N° 5 : M. R.....

Premier séjour à Sércourt de mars 1942 à mars 1943. Cliniquement guéri à la sortie. BK = 0. Reprise de travail le 8 mai 1943. Octobre 1943, Hi = 1,25. Avril 1944, Hi = 1,75. Arrêt de travail le 22 novembre 1944, pour hémoptysie et fièvre. A l'entrée au Sanatorium, le 7 décembre 1944, son indice d'haptoglobine est de 2,70.

Ces observations, entre autres, paraissent donc bien donner à la détermination de l'indice d'haptoglobine, la valeur d'un test précoce d'alarme ; cette constatation a d'autant plus d'intérêt, qu'elle avait déjà été faite par E. Brissaud et qu'elle a récemment été confirmée par Renaud et Lemoine [60].

Nous ne saurions, enfin, suffisamment insister sur l'importance de l'indice inférieur à l'unité, pour juger de la consolidation d'une lésion. La statistique que nous présentons dans le chapitre suivant sur les indices de

sortie est particulièrement expressive et donne à cet élément d'appréciation un caractère très absolu.

Pour illustrer l'ensemble de ces remarques, nous présentons sur les figures 20, 21 et 22, des haptoglobinogrammes, que nous avons pris au hasard parmi ceux qui ont été effectués au Sanatorium de Sércourt. Sur la figure 20, nous avons indiqué les tracés de 3 malades, qui ont présenté une évolution défavorable et sont sortis du Sanatorium avec un pronostic désespéré. On constate que leurs haptoglobinogrammes ont une pente ascendante et que leurs chiffres terminaux sont très élevés. En voici les observations succintes :

Tracé N° 1 : M. C.....

Arrêt de travail en septembre 1945 pour fièvre, toux, expectoration, amaigrissement, BK +. Tentative infructueuse de pneumothorax. A l'entrée au Sanatorium Hi = 2,60.

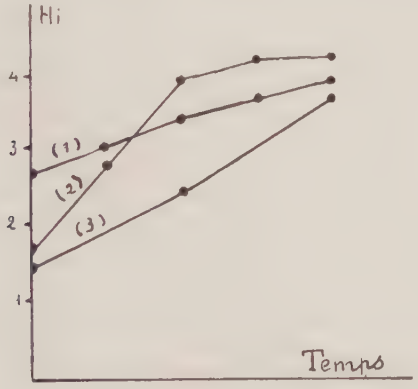

FIGURE 20. — Exemples d'évolutions défavorables au cours de la cure.

A la radio : tuberculose pulmonaire multiexcavée, très évolutive, très mauvais état général. Aggravation continue. Son indice Hi monte continuellement jusqu'à 4. Décès en mars 1946.

Tracé N° 2 : M. D.....

Arrêt de travail en octobre 1944. Hémoptysie, toux, expectoration, BK+. Entrée à Séricourt en avril 1945. Tuberculose pulmonaire droite excavée, quelques taches à gauche. Hi = 1,80. En mai 1945, création d'un pneumothorax inefficace. En octobre, Hi = 2,80. En décembre, épanchement liquidien, Hi = 4. Malgré ce chiffre élevé, on décide une thoracoplastie. Bilatéralisation immédiate. Aggravation continue. Sort du Sanatorium dans un état désespéré, Hi = 4,25.

Tracé N° 3 : M. G.....

Arrêt de travail en novembre 1945, pour hémoptysie. Entrée à Séricourt en janvier 1946 : tuberculose bilatérale ; l'indice Hi monte très rapidement avec l'aggravation des lésions jusqu'à 3,75. Le malade sort du Sanatorium, inapte à tout travail.

La figure 21, par opposition à la précédente, montre les haptoglobinogrammes de plusieurs malades ayant

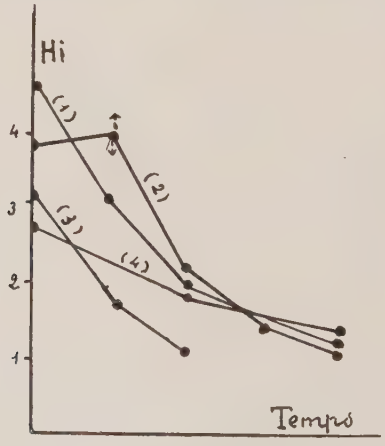

FIGURE 21. — Exemples d'évolutions favorables sous l'influence de la collapsothérapie.

évolué favorablement, à la suite de l'institution d'une collapsothérapie. Parmi les quatre tracés représentés, nous avons choisi trois malades dont l'indice était parti-

culièrement élevé à leur entrée au Sanatorium, indiquant, conformément aux données que nous avons exposées plus haut, un terrain peu résistant à l'attaque du Bacille de Koch. Une collapsothérapie efficace peut donc avoir raison de lésions très fortement évolutives, mais il est probable que de tels malades seront davantage exposés aux rechutes ultérieures que ceux dont l'indice d'entrée n'était pas supérieur à 2,5.

Tracé N° 1 : M. A.....

Arrêt de travail en septembre 1943 pour toux, expectoration, BK +. Entrée au Sanatorium en janvier 1944, tuberculose bilatérale, excavée à gauche, Hi = 4,60. Thoracoplastie en trois temps, efficace. Effacement cavitaire, reprise de poids de 14 kg. L'indice Hi tombe rapidement, pour atteindre 1,30 à la sortie du malade, en mai 1945.

Tracé N° 2 : M. C.....

Arrêt de travail en avril 1945. Entrée au Sanatorium en mai 1945, tuberculose bilatérale excavée, Hi = 3,85. Création d'un pneumothorax droit. Effacement cavitaire, disparition des B.K., reprise de poids.

Hi de sortie = 1,20 en octobre 1945.

Tracé N° 3 : M. P.....

Arrêt de travail en octobre 1944, pour fatigue, BK +. Entrée au Sanatorium en février 1945 : poumon gauche avec semis nodulaire étendu, ulcérations tuberculeuses de la bouche, Hi = 3,10.

Création d'un pneumothorax efficace.

Disparition des BK ; Hi de sortie = 1,10.

Tracé N° 4 : M. G.....

Arrêt de travail en décembre 1944, pour hémoptysie, BK +. Entrée au Sanatorium en mai 1945 : tuberculose bilatérale, largement excavée à droite, Hi = 2,50. Création d'un pneumothorax. Effacement cavitaire rapide, reprise de poids, disparition des BK. Sortie en mai 1946, avec Hi = 1,20.

La figure 22 indique l'enregistrement par l'haptoglobinogramme de complications survenues au cours du trai-

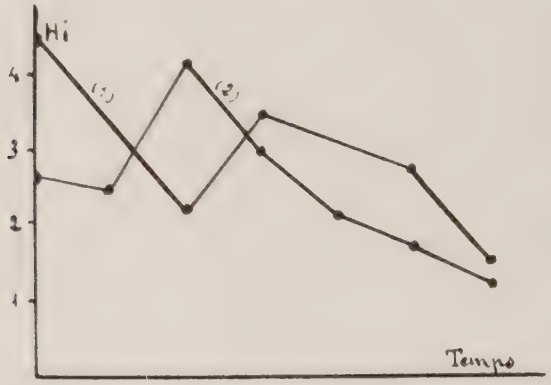

FIGURE 22. — Exemples d'évolutions favorables après incidents pathologiques divers.

tement de deux tuberculeux, dont nous relatons les observations résumées :

Tracé N° 1 : M. A.....

Arrêt de travail en février 1944, pour fatigue, fièvre, BK +. Entrée au Sanatorium en mars 1944 : tuberculose bilatérale, excavée à gauche. Hi = 4,50. Création d'un pneumothorax gauche. Effacement cavitaire. En avril 1944, Hi = 2,25. Quelques mois plus tard, apparition de liquide puriforme, Hi 3,50. Ponctions, lavages de plèvre. Résultats satisfaisants. L'indice d'haptoglobine revient progressivement vers la zone normale.

Trace N° 2 : M. L.....

Arrêt de travail en octobre 1943. Entrée au Sanatorium en décembre 1943 : tuberculose bilatérale excavée, BK +, Hi 2,55.

Création d'un pneumothorax gauche en janvier 1944, paraissant efficace. Mais en février 1944, extension de la caverne droite. Hi = 4,10. Création d'un pneumothorax droit. Effacement cavitaire. Evolution favorable et sortie du Sanatorium avec un indice sensiblement normal.

Intérêt de l'haptoglobine en hygiène sociale.

Le travail à la fois le plus original et le plus frappant, que nous avons réalisé dans le domaine clinique, résulte de la confrontation des indices d'haptoglobine présentés par 163 malades à leur sortie de Sanatorium de Sérigourt et de l'évolution ultérieure de leurs lésions tuberculeuses. Grâce à l'organisation de la lutte antituberculeuse dans la région « Est » de la S.N.C.F. et à l'intérêt que MM. les docteurs Bidermann et Alibert ont porté à cette étude, il fut possible de suivre ces malades après leur sortie et de les convoquer à différentes périodes, pour mesurer leur indice d'haptoglobine.

TABLEAU XXIII.

Hi de sortie	Evolutifs	Douteux	Cliniquement guéris dont Hi a diminué par la suite	Cliniquement guéris dont Hi s'est maintenu	Rechutes ultérieures	Pourcentage des rechutes
< 1				32	1	3 p. 100
1 -1,3				37	5	12 p. 100
1,3-1,5				11	2	15 p. 100
1,5- 2			1	9	10	50 p. 100
2-3	5	3	8	2	12	55 p. 100
3-5	19	1		1	4	80 p. 100

(Les nombres portés sur le tableau représentent les malades des catégories correspondantes).

L'ensemble des résultats est condensé dans le tableau XXIII. Les malades sont classés, à leur sortie, en trois catégories distinctes. Ceux qui restaient franchement évolutifs, ceux qui étaient cliniquement guéris et qui reprenaient une activité partielle ou totale et enfin ceux pour lesquels, bien qu'améliorés, le pronostic était réservé.

Les malades évolutifs, au nombre total de vingt-quatre, ont tous un indice supérieur à 2, et même compris entre

3 et 5 chez dix-neuf d'entre eux. Dans dix-huit cas, la mort est survenue peu après leur sortie du sanatorium.

La catégorie la plus intéressante est évidemment celle des malades cliniquement guéris, car on pouvait se demander si l'indice d'haptoglobine de sortie et l'haptoglobinogramme effectué après la cure sanatoriale, pouvaient permettre d'évaluer la qualité de la guérison et servir de bases à un pronostic d'avenir. Le tableau XXIII répond éloquemment à cette question. Il indique que le pourcentage des rechutes ultérieures est inversement proportionnel au taux de l'indice à la sortie du Sanatorium. Sur cinq malades présentant, à leur sortie, un indice supérieur à 3, en dépit de leur état clinique favorable, quatre, soit 80 p. 100, ont rechuté par la suite. Vingt-deux malades cliniquement guéris avaient un indice compris entre 2 et 3. Douze, soit 55 p. 100, ont présenté ultérieurement des poussées évolutives. Chez huit malades, l'indice est revenu à la normale progressivement, ce qui prouve que la guérison humorale est souvent plus tardive que la stabilisation clinique. Chez deux malades seulement, la concentration de l'haptoglobine s'est maintenue au même niveau au cours des dosages ultérieurs, en dépit de leur état stationnaire. Il est à noter toutefois, que l'un d'eux présentait une réaction liquidienne qui justifiait son indice élevé. Le pourcentage des rechutes est encore de 50 p. 100 chez les vingt malades dont l'indice de sortie était compris entre 1,5 et 2. Un de ces malades eut un indice qui revint à la normale ; les neuf restants ont été suivis cliniquement et se sont maintenus dans un état de santé satisfaisant, malgré la reprise progressive de leur travail. Nous n'eûmes malheureusement pas l'occasion de refaire chez eux de nouvelles mesures de Hi, après leur sortie du sanatorium. Le pourcentage des rechutes tombe à 15 p. 100 chez treize malades dont l'indice était, à leur sortie, dans la zone de transition entre les chiffres normaux et pathologiques, soit entre 1,3 et 1,5. Il n'est plus que de 12 p. 100 chez les quarante-deux ma-

lades dont l'indice est à la limite supérieure de la zone normale, entre 1 et 1,3. Mais chez les trente-trois malades qui avaient à leur sortie un indice inférieur à l'unité, il est remarquable de constater qu'un seul présenta une rechute et encore celle-ci fut tellement bénigne qu'il est possible de considérer que le pourcentage s'est pratiquement annulé. Sur ces trente-trois malades, vingt-quatre étaient bacillaires à leur entrée au Sanatorium et neuf seulement présentaient des formes inactives avec bacilloscopie constamment négative. Sur les vingt-quatre bacillaires, quatorze étaient cavitaires.

L'indice d'haptoglobine nous apparaît donc comme le meilleur test permettant au clinicien de juger de la consolidation d'une lésion et, par voie de déduction, de la qualité de la guérison et du pronostic d'avenir. En règle, le tuberculeux guéri a un indice qui revient tôt ou tard dans la zone normale et, s'il est au repos et exempt de toute infection intercurrente, son taux d'haptoglobine doit tomber à une valeur inférieure à l'unité. Le tuberculeux qui sort du Sanatorium avec un indice encore élevé, ou bien n'est pas complètement guéri, malgré l'amélioration clinique, et, si on le suit ultérieurement, on constate que les signes humoraux rejoignent bientôt les signes cliniques ; ou bien il est encore évolutif et il rechutera dans un délai variable.

Le dosage de l'haptoglobine donne ici toute sa mesure, car nous avons montré précédemment qu'aux indices inférieurs à 1,7, correspondaient des vitesses de sédimentation comprises entre 0 et 10, auxquelles il n'est pas possible d'attribuer une valeur quelconque. La haute sensibilité et la spécificité du dosage de ce glycoprotéide, permettent au contraire d'interpréter les chiffres de la zone normale, avec la même rigueur que ceux de la zone pathologique. Le sujet au repos, à l'abri de toute infection, de toute fatigue, présente des indices plus bas que les sujets ambulatoires et, chez eux, le taux de l'haptoglobine peut être rapporté au processus tuberculeux. Le

retour au-dessous de l'unité, indique que la consolidation est totale et il réduit au minimum le risque de rechute future.

On pourrait objecter à notre statistique d'être un peu récente, puisque les malades suivis sont sortis du Sanatorium depuis une période qui varie de une à trois années. Néanmoins, elle donne une idée de ce que l'on est en droit d'attendre de la pratique systématique des dosages d'haptoglobine en phtisiologie. Certes, le malade qui présente à sa sortie du Sanatorium, une guérison totale, clinique et humorale, associée à un bon état général, n'est pas à l'abri de rechutes dans un avenir plus ou moins éloigné, mais on peut dire que celles-ci seront d'autant moins probables que son taux d'haptoglobine sera descendu à un niveau plus bas. En revanche, on peut affirmer qu'il est dangereux de remettre en activité des malades dont l'indice se situe encore dans la zone pathologique, surtout dans les cas où ces sujets ne seront pas suivis avec beaucoup de soins par la suite.

Nous n'avons pas envisagé le devenir des tuberculeux classés sur notre tableau dans une catégorie intermédiaire entre les progressifs et les cliniquement guéris. Ce sont des sujets qui sortent améliorés du Sanatorium, sans qu'il soit possible d'affirmer cliniquement leur guérison effective. Ils sont au nombre de quatre, dont les Hi sont supérieurs à 2. Il s'agit de malades ayant présenté des lésions très importantes et qui n'ont pas repris leur travail.

En conclusion, la technique de dosage de l'haptoglobine nous apparaît comme un progrès considérable réalisé dans la mesure des réactions humorales non spécifiques. La vitesse de sédimentation globulaire est, en fait, une méthode indirecte et approximative de détermination de l'haptoglobine. C'est pourquoi ses résultats vont dans le même sens que l'indice d'haptoglobine, quand le sérum contient suffisamment de ce glycoprotéide. La méthode de Biernacki manque de précision et est influencée par

de multiples facteurs. Elle a cependant l'avantage de la rapidité d'exécution. Le dosage de l'haptoglobine allie spécificité et précision. Il indique le taux d'une substance déterminée, avec autant de rigueur qu'un dosage d'urée ou de glucose. Il n'existe donc pas de seuil, comme dans le cas de la vitesse de sédimentation, au-dessous duquel on ne peut plus accorder à un chiffre, un crédit quelconque.

Dans ce travail, nous avons cherché à tirer une impression statistique des résultats, car on a trop souvent tendance, surtout en médecine, à se laisser impressionner par des cas discordants et à en tirer des conclusions. Au contraire, la classification objective et scientifique des résultats élimine les impressions individuelles et fait ressortir la notion générale qui s'en dégage.

Qu'il nous soit donc permis d'espérer que cette méthode récente entre dans la pratique clinique courante, en particulier en phtisiologie, où elle apportera au praticien un nouvel élément d'information aussi rigoureux dans sa détermination que précieux dans son interprétation.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Nous résumerons ainsi les conclusions qui se dégagent de l'ensemble de nos recherches :

1°) Dans la première partie de notre travail, nous avons entrepris l'étude systématique des différents facteurs intervenant dans l'action catalytique du complexe « Haptoglobine- Hémoglobine » à savoir :

a) Les modalités de la conjugaison de l'hémoglobine avec l'haptoglobine.

b) Le sulfate d'ammoniaque, dont le pouvoir inhibiteur s'est révélé relativement faible, mais dont nous avons néanmoins tenu compte au cours de nos expériences.

c) L'iodure de potassium : nous avons constaté que la courbe de sa concentration, en fonction de l'activité peroxydasique, tendait rapidement vers un maximum.

d) Le peroxyde : la courbe de sa concentration moléculaire, en fonction de l'activité du complexe « Hb-Hp », correspond à la loi de MICHAELIS, contrairement à ce qui se produit avec l'hémoglobine seule.

e) Le pH, dont le point optimum se situe entre 4,2 et 4,4 pour le complexe, mais demeure fonction de la concentration du peroxyde et de la température.

f) La température, dont nous avons déterminé l'optimum sur les courbes d'activité.

En partant de ces différentes données, nous avons cherché à sensibiliser la méthode de dosage de l'haptoglobine établie par M.-F. JAYLE. Ce résultat fut obtenu en augmentant la concentration de l'iodure de potassium. Nous

ne pûmes modifier les autres facteurs, sans risquer de nuire à la fidélité de la méthode.

2°) Dans la seconde partie, nous avons étudié la précipitation de l'haptoglobine du sérum de cheval, par différents sels neutres : sulfate d'ammoniaque, sulfate de magnésie, sulfate de soude, chlorure de sodium, acétate de potassium et phosphates mono et bipotassiques. Nous pûmes constater, en particulier, que le pouvoir de précipitation du mélange de phosphates mono et bipotassiques était identique à celui du sulfate d'ammoniaque, lorsqu'on ajoutait 0,12 à la molarité de ce dernier.

Nous avons étudié l'effet de dénaturation de l'haptoglobine par le sulfate d'ammoniaque et le phosphate de potassium. Cette dénaturation est plus importante avec le sulfate d'ammoniaque qu'avec le phosphate de potassium, mais elle est surtout fonction de la concentration saline.

Mais notre objectif principal a été de rechercher si l'haptoglobine était une protéine homogène et si le tracé de sa précipitation saline obéissait à la loi de Cohn, en dépit de la présence à ses côtés d'une foule de protéines étrangères. Nous avons constaté :

a) Que le tracé de la précipitation saline de l'haptoglobine était logarithmique.

b) Que la pente du tracé dépendait du sel utilisé, mais était indépendante de la température et du pH.

c) Que, pour une technique donnée, le début et la fin de la précipitation de l'haptoglobine étaient toujours les mêmes pour une espèce animale déterminée, et ceci, quelle que soit la concentration du sérum en haptoglobine.

d) Que, si l'on mélangeait les solutions sans précautions, la zone de précipitation de l'haptoglobine était comprise, avec le sulfate d'ammoniaque, entre les indices de saturation 0,50 et 0,65 pour le cheval (zone des albumines) et entre les indices 0,4 et 0,5 pour l'homme (zone des globulines).

e) Que si l'on introduisait au contraire la solution saline par diffusion, le début de la précipitation était décalé vers les fortes molarités et l'étendue de la zone de précipitation réduite de façon importante par rapport à ce qu'elle était précédemment (d).

Dans les deux cas, d et e, les tracés demeurent néanmoins logarithmiques et superposables d'un sérum à l'autre.

On peut conclure de cette étude que l'haptoglobine est un protéide homogène, mais que la pente de son tracé logarithmique de précipitation saline est influencée par les autres protéines sériques. Le mode d'introduction du sel au cours de la précipitation est de la plus haute importance pour le fractionnement des protéines. Quant à la dilution préalable du sérum, elle n'influence véritablement que l'entraînement mutuel des protéines et non pas la zone de précipitation proprement dite.

L'haptoglobine est une preuve supplémentaire à l'appui de la fragilité du fractionnement classique du sérum en « sérine » et « globuline ». Une même protéine, l'haptoglobine, est, selon les espèces, une globuline ou une albumine. D'autre part, dans une série d'expériences où nous avons complexé avec un excès d'hémoglobine, la totalité de l'haptoglobine sérique, nous avons réussi à modifier complètement les caractères de floculabilité de cette dernière. En effet, l'haptoglobine humaine qui est, en règle, une globuline, précipite avec les albumines quand elle est associée à l'hémoglobine.

3°) La dernière partie de nos recherches a été consacrée à l'étude clinique de l'haptoglobine.

Nous avons tout d'abord confirmé et précisé le parallélisme qui existe entre les mesures de la vitesse de sédimentation globulaire et celles de l'indice d'haptoglobine. Mais il n'y a correspondance entre les deux méthodes, que si l'indice d'haptoglobine est supérieur à 1,7. On trouve alors, sur la courbe statistique, une proportionnalité rigoureuse et linéaire entre la vitesse de sédimentation et

l'indice d'haptoglobine, quand celui-ci est compris entre 1,7 et 5. Au-dessous de 1.7, il n'y a plus aucun rapport entre les deux techniques, car la sédimentation est influencée, dans cette zone, par de multiples facteurs. Ces résultats montrent que la supériorité de l'indice d'haptoglobine sur la méthode de WESTERGREEN, est encore plus grande pour les chiffres des zones subnormale et normale, que pour ceux de la zone pathologique.

Nous avons ensuite effectué chez les tuberculeux du Sanatorium de Séricourt (S.N.C.F.) plus de 1.700 dosages d'haptoglobine et nous avons précisé, avec MM. les Docteurs MERY et LEROLLE, l'intérêt clinique considérable que présente cette méthode en phtisiologie

Nous avons d'autre part effectué environ 1.300 déterminations d'indices au Service Médical de la Région Est de la S.N.C.F., à Paris, et nous avons particulièrement suivi les malades, après leur sortie du Sanatorium de Sericourt. Il résulte de cette dernière étude, que l'haptoglobine permet de juger de la consolidation d'une lésion tuberculeuse et présente un grand intérêt pronostique.

Vu le Président de Thèse.
P. FLEURY.

Vu : Le Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris,
RENÉ FABRE.

Vu : Et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris,
ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE.

1. H. Wieland et A. Wingler. — *Lieb. A.*, 1923, **431**, 301.
2. Szent-Györgyi. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 848.
3. W. Manchot et W. Pflaum. — *Zs. anorg. Ch.*, 1933, **1**, 211.
4. a) Engler et Weissberg. — Kritische Studien über die Vorgänge der Autooxydation, 1904, 82. Braunschweig-Wieweg.
   b) Bach et Chodat. — *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1902, **35**, 2466.
5. A. Job. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, **33**, 1561.
6. M. Polonovski, M. F. Jayle et M^lle^ Glotz. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 48.
7. J. Wolff et E. de Stoecklin. — *C. R. Ac. Sc.*, 1910, **151**, p. 483 ; *Ann. Inst. Past.*, 1911, **1**, 313.
8. F. Haurowitz. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1924, **137**, 62 ; *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1924, **138**, 9 ; *Enzymologia*, 1937, **2**, 9 ; *Enzymologia*, 1937, **4**, 139.
9. Schönbein. — *Jour. of prakt. Chem.*, 1858, **72**, 78.
10. Wieland et Sutter. — *Ber. Ch. Ges.*, 1926, **59**, 1180.
11. Saïd Ishak. — Thèse de doctorat ès Sciences. Paris, 1940, p. 176.
12. Saïd Ishak. — Thèse de doctorat ès Sciences. Paris, 1940, p. 73.
13. M. F. Jayle. — Thèse de doctorat en médecine. Paris, 1939.
14. R. Kühn et L. Braun. — *Ber. Chem. Ges.*, 1926, **59**, 2370.
15. Saïd Ishak. — Thèse de doctorat ès Sciences. Paris, 1940, p. 85.
16. Willstätter et Stoll. — *Lieb. A.*, 1918, **416**, 21.
17. B. J. G. Mann. — *Bioch. Journ.*, 1931, **25**, 1928.
18. Willstätter et Pollinger. — *Lieb.*, 1927, **430**, 269.
19. M. F. Jayle. — Exposés annuels. *Bioch. Méd.*, 1942, **3**, p. 176.
20. Abdellatif. — Thèse doctorat ès Sciences. Paris, 1945.
21. Lépine. — *Lyon Médical*, 1913, p. 997.
22. Rimington. — *Bioch. J.*, 1929, **23**, 430.
23. Bierry. — a) Introduction à la physiol. des sucres, 1935. Baillière, Paris.
   b) *C. R. Ac. Sciences*, 1930, **191**, 1381.
24. Sörensen et Haugaard. — *C. R. Labor. de Karlsberg*, 1933, **19**, 1.
25. Bierry. — *Bull. Soc. Chim biol.*, 1941, **23**, 1174.
26. Hewitt. — *Bioch. J.*, 1938, **32**, 1554.
27. Rimington. — *Bioch. J.*, 1940, **34**, 931.

28. Lustig et Haas. — *Bioch. Zeit.*, 1931, **231**, 487.
29. Tillmans et Philippi. — *Bioch. Zeit.*, 1929, **213**, 36.
30. Hewitt. — *Bioch. J.*, 1939, **33**, 1496.
31. Nillsson. — *Bioch. Zeit.*, 1937, **291**, 254.
32. Hewitt. — *Bioch. J.*, 1934, **28**, 2080.
33. Hewitt. — *Bioch. J.*, 1936, **30**, 2229.
34. Hewitt. — *Bioch. J.*, 1939, **32**, 26.
35. Rimington. — *Bioch. J.*, 1940, **34**, 931.
36. Mc Meekin. — *J. Biol. Chem.*, 1940, **62**, 3395.
37. Blix, Tiselius et Svensson. — *J. Biol. Chem.*, 1941, **137**, 485.
38. Roger, Rathery et Binet. — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 1228.
39. Bierry, Rathery et Bordet. — *C. R. Ac. Sciences*, 1922, **174**, 970.
40. Dumazert et Penet. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, **23**, 1042.
41. Dumazert et Lévy. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 1274.
42. Cohn, Luetscher, Oncley et Armstrong. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3396.
43. Mellanby. — *Proc. Roy. Soc.* (London), séries B, 1908, **80**, 399.
44. Hardy et Gardiner. — *J. Physiol.*, 1910, **40**, 58.
45. M. F. Jayle. — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1942, **3**, 177.
46. Polonovski, Jayle et M^lle^ Fraudet. — *C. R. Ac. Sc.*, 1941, **213**, 740.
47. Keilin et Hartree. — *Proc. of the Royal Soc.*, 1937, B **121**, 172.
48. Bayer et Villiger. — *Ber. Chem. Ges.*, 1900, **33**, 387.
49. Rieche et Hirtz. — *Ber. Chem. Ges.*, 1929, **62**, 2458.
50. M. F. Jayle, Saïd Ishak et P. Gillard. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **1**, p. 66.
51. Willstätter et Pollinger. — *Lieb. Ann.*, 1927, **430**, 269.
52. M. F. Jayle. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, **21**, 14.
53. M. F. Jayle. — *C. R. Ac. Sciences*, 1940, **211**, 574.
54. M. F. Jayle. — *Exposés Ann. Bioch. Méd.*, 1945, **5**, 105.
55. Polonovski. — *Schweiz. Med. Woch.*, Oct. 1945, 859.
56. Ch. Gernez-Rieux, Warembourg et Crampon. — *Rev. Tub.*, Nov.-Déc. 1941, p. 534.
57. M. F. Jayle. — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1942, **3**, 189.
58. Bennhold. — a) Eiweisskörper des Blutplasma, Steinkopf, Dresden, 1938.
b) *Klin. Wschr.*, 1924, **3**, 1711.
59. M. F. Jayle. — *Presse Médicale*, 4 Mai 1946, p. 281.
60. Lemoine. — Thèse de doctorat en Médecine, Paris, Déc. 1946.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

Introduction 11

CHAPTRE I.

Etat actuel de la biochimie de l'haptoglobine..... 15

1° Catalyse minérale des réactions d'oxydation par les peroxydes 15

2° Activité catalytique de l'hématine et de ses dérivés 18

3° Activité enzymatique comparée de l'hémoglobine et des peroxydases végétales 19

A. — Spécificité et affinité..... 19

B. — Influence du pH 21

C. — Influence de la concentration en iodure 23

D. — Influence de la concentration en peroxyde 24

E. — Influence de la concentration de l'enzyme 25

F. — Cinétique de la réaction en fonction du temps 27

G. — Influence inhibitrice de l'iode..... 28

4° Propriétés enzymatiques du complexe hémoglobine-haptoglobine 29

A. — Influence du pH 30

B. — Influence de la concentration du peroxyde 31

C. — Cinétique de la réaction..... 31

D. — Influence de l'iode 32

Pages

E. — Influence de la concentration de « Hb-Hp » 32

5° Etude de la constitution de l'haptoglobine..... 33

A. — Constitution chimique de l'haptoglobine 33

B. — Position de l'haptoglobine parmi les glycoprotéides sériques identifiés..... 36

6° Théorie nouvelle sur la constitution enzymatique 46

CHAPITRE II.

Exposé technique 51

Vérification du matériel 51

Techniques de dosage de l'haptoglobine..... 51

Techniques de précipitation par les sels neutres.. 60

Technique de dosage du sucre protéidique..... 64

CHAPITRE III.

Recherches personnelles 65

Première partie.

Etude systématique des différents facteurs intervenant dans l'action catalytique du complexe « haptoglobine-hémoglobine » 65

1° Influence de la dilution sur la combinaison « Hb-Hp » 65

2° Influence du SO_4 $(NH_4)_2$ sur la réaction peroxydasique 66

3° Tamponnement de la réaction..... 67

4° Influence de la concentration en iodure de potassium 67

5° Influence de la concentration en peroxyde.... 68

6° Influence du pH 70

7° Influence de la température au pH optimum.... 71

8° Recherche des conditions expérimentales permettant de doubler approximativement l'activité peroxydasique, par rapport à celle réalisée dans la technique d'activation de M.-F. Jayle..... 72

Pages

9° Etude de l'activité peroxydasique en fonction de la concentration du complexe enzymatique « Hb-Hp » 73

Deuxième partie.

Etude systématique de la précipitation de l'haptoglobine par les sels neutres 79

1° Précipitation de l'haptoglobine par le sulfate d'ammoniaque et le phosphate de potassium... 80

2° Précipitation de l'haptoglobine par les sulfates d'ammoniaque, de magnésie et de sodium..... 83

3° Précipitation de l'haptoglobine par le chlorure de sodium et l'acétate de potassium..... 85

4° Dénaturation de l'haptoglobine par les sels neutres 87

5° Influence du pH sur la précipitation de l'haptoglobine 89

6° Influence du mode d'introduction de la solution saline sur la précipitation de l'haptoglobine.. 92

7° Influence de la dilution sur la précipitation de l'haptoglobine 97

8° Précipitation comparée de l'haptoglobine, de l'hémoglobine et du complexe « hémoglobine-haptoglobine » 101

9° Précipitation de l'haptoglobine de sérums humains par le sulfate d'ammoniaque 105

10° Précipitation de l'haptoglobine de sérums humains par le phosphate de potassium..... 107

Résumé 111

CHAPITRE IV.

Etude clinique de l'haptoglobine 113

Première partie.

Généralités 113

Historique 113

Vitesse de sédimentation 114

Indice d'haptoglobinémie 116

Raison physiopathologique de l'haptoglobinémie.. 121

Pages

Deuxième partie.

Recherches personnelles 126

Haptoglobine et vitesse de sédimentation..... 128

Etude de l'indice d'haptoglobine au cours du traitement de la tuberculose pulmonaire..... 131

Intérêt de l'haptoglobine en hygiène sociale..... 141

Conclusion 144

Conclusions générales 147

Bibliographie 151

M. Declume, Imp., Lons-le-S. (31.2160). — 3097-46-325.
Mars 1947 « Dépôt légal 1er trimestre 1947. N° 3632 ».